



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE
Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

**CONFRONTO TRA IL CORPO LUTEO CICLICO E
GRAVIDICO NELLA BOVINA DA LATTE:
RILIEVI CLINICI ED ECOGRAFICI**

**COMPARISON OF THE CYCLIC AND PREGNANT CORPUS
LUTEUM IN DAIRY COW:
CLINICAL ASPECTS AND ULTRASONOGRAPHIC FEATURES**

Relatore:
Prof.ssa Carla BRESCIANI

Correlatore:
Dott.ssa Mara MORELLI

Laureanda:
Francesca TAFFARELLO

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

ABSTRACT	5
RIASSUNTO	6
INTRODUZIONE	7
CAPITOLO 1: L'ANATOMIA E TOPOGRAFIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLA BOVINA	9
1.1. LE GONADI FEMMINILI.....	10
1.1.1. I FOLLICOLI.....	13
1.1.2. IL CORPO LUTEO	16
1.2. IL TRATTO GENITALE	18
CAPITOLO 2: LA DINAMICA OVARICA.....	21
2.1. LE FASI DEL CICLO ESTRALE.....	22
2.1.1. IL METAESTRO	22
2.1.2. IL DIESTRO	23
2.1.3. IL PROESTRO E L'ESTRO	23
2.2. CONFRONTO TRA ATTIVITÀ DEL CORPO LUTEO CICLICO E GRAVIDICO	25
CAPITOLO 3: LA VISITA CLINICO GINECOLOGICA	27
3.1. DIAGNOSI DI GRAVIDANZA PRECOCE MEDIANTE PALPAZIONE RETTALE	32
CAPITOLO 4: TEST BIOCHIMICI PER LA DIAGNOSI DI	34
GRAVIDANZA PRECOCE	34
4.1. IL DOSAGGIO DEL PROGESTERONE (P4)	35
4.2. ALTRI TEST.....	36
CAPITOLO 5: ULTRASONOGRAFIA IN GINECOLOGIA BOVINA.....	38
5.1. TECNICHE ECOGRAFICHE E STRUMENTI	39
5.2. CARATTERISTICHE ECOGRAFICHE DELLE STRUTTURE OVARICHE.....	42
5.2.1. I FOLLICOLI.....	42

5.2.2. IL CORPO LUTEO	43
5.3. DIAGNOSI DI GRAVIDANZA PRECOCE MEDIANTE VISITA ECOGRAFICA	45
CAPITOLO 6: CONTRIBUTO SPERIMENTALE	46
6.1. SCOPO DELLO STUDIO.....	47
6.2. MATERIALI E METODI.....	47
6.3. RISULTATI	53
6.4. DISCUSSIONE.....	63
CONCLUSIONI	66
BIBLIOGRAFIA	67

ABSTRACT

The corpus luteum (CL) is a transient endocrine gland, which forms at the ovarian level after ovulation of a follicle. In cow (*Bos taurus*), it regresses after 17-18 days to the start a new oestrous cycle. In case of successful fertilization, CL persists for the entire duration of pregnancy, secreting progesterone (P4), which is a hormone essential for maintaining pregnancy. The aim of the study was to analyze the characteristics of CL, by clinical and ultrasound findings, *in vivo*. To identify any differences between the CLs of pregnant and non-pregnant cows at 21 days post artificial insemination (AI), in terms of morphological features detected with palpation. To assess size and echogenicity, from ultrasound images using software.

A total of 60 cows were enrolled, artificially fertilized, and then examined at 21 days post AI, by clinical gynecological examination and ultrasound examination. Data were collected regarding external features (vulva, behavioral status of the cow) and elevations on palpation (presence of CL, shape, laterality, turgidity, status of uterus and cervix), as well as assessment of echogenicity of CL by operator-assigned score. The collected ultrasound images were analyzed by software to establish size and echogenicity of the CL. Subsequently, the same cows were revisited at 31 days post FA for confirmation diagnosis of pregnancy, and ultrasound images of CLs were recorded.

Upon reprocessing using image analysis software and statistical analysis, it was found that: the ovary that ovulates most frequently is the right ovary (75%), the size (diameters, area, perimeter) and echogenicity (mean pixel values and heterogeneity) of the CL at 21 days are not indicative of "pregnancy status." There are no significant differences between cyclic and gravid CLs at 21 days in terms of size and echogenicity. There tended to be a significant difference between the areas of gravid CLs at 21 and 31 days, while a relationship was found between the cross-sectional diameters of gravid CLs at 21 and 31 days represented by polynomial regression.

RIASSUNTO

Il corpo luteo (CL) è una ghiandola endocrina transitoria, si forma a livello ovarico in seguito all'ovulazione di un follicolo. Nella bovina (*Bos taurus*), regredisce dopo 17-18 giorni per determinare l'inizio di un nuovo ciclo estrale. In caso di avvenuta fecondazione, il CL persiste per l'intera durata della gravidanza, secernendo progesterone (P4), ormone fondamentale per il mantenimento della gravidanza. Lo studio è volto ad analizzare le caratteristiche del CL, tramite rilievi clinici ed ecografici, *in vivo*. Individuare eventuali differenze tra i CL di bovine gravide e non gravide a 21 giorni post fecondazione artificiale (FA), in termini di caratteristiche morfologiche rilevate alla palpazione. Valutare dimensioni ed ecogenicità, da immagini ecografiche tramite software.

Sono state arruolate 60 vacche, fecondate artificialmente e poi visitate a 21 giorni post FA, tramite visita clinico ginecologica ed esame ecografico. Sono stati raccolti dati in merito a caratteristiche esterne (vulva, stato comportamentale della bovina) e rilievi alla palpazione (presenza di CL, forma, lateralità, turgidità, stato dell'utero e della cervice), nonché valutazione dell'ecogenicità del CL tramite punteggio assegnato dall'operatore. Le immagini ecografiche raccolte sono state analizzate mediante software per stabilire dimensioni ed ecogenicità del CL. Successivamente le medesime vacche sono state rivisitate a 31 giorni post FA, per la diagnosi di conferma di gravidanza e sono state registrate le immagini ecografiche dei CL.

In seguito a rielaborazione mediante software di analisi di immagini e analisi statistica è risultato che: l'ovaio che ovula più frequentemente è quello di destra (75%), le dimensioni (diametri, area, perimetro) ed ecogenicità (media valori pixel ed eterogeneità) del CL a 21 giorni non sono indicative di "stato di gravidanza". Non vi sono differenze significative tra i CL ciclici e gravidici a 21 giorni in termini di dimensioni ed ecogenicità. Vi è tendenzialmente una differenza significativa tra le aree dei CL gravidici a 21 e a 31 giorni, mentre è stata riscontrata una relazione tra i diametri trasversali dei CL gravidici a 21 e 31 giorni rappresentata da una regressione di tipo polinomiale.

INTRODUZIONE

La fertilità rappresenta il fulcro del ciclo produttivo nelle aziende lattiero-casearie. Gli aspetti fisiologici e patologici della bovina da latte, sia in ambito riproduttivo che clinico, devono essere oggetto di continui studi da parte della comunità scientifica, con l'obiettivo di migliorare l'efficienza riproduttiva delle bovine da latte.

L'instaurarsi della gravidanza presuppone il successo di una serie di eventi basati inizialmente su di un fisiologico ciclo estrale, l'avvenuta fecondazione mediante incontro di spermatozoo e oocita, il riconoscimento materno della gravidanza e successivamente l'impianto del *conceptus* a livello di endometrio.

Il riconoscimento materno della gravidanza include il processo che genera un segnale biochimico impedendo la regressione luteale, consentendo al corpo luteo (CL) di persistere e continuare a secernere un'adeguata quantità di progesterone (P_4), per tutta la durata della gravidanza. Dunque, una bovina gravida, tra i 21 – 24 giorni post-ovulazione, dovrebbe presentare persistenza del CL, un elevato livello di P_4 e il mancato ritorno in estro. Tuttavia, una diagnosi basata su tali caratteristiche ha un'affidabilità ridotta a causa di: possibile durata maggiore del ciclo estrale o ciclo ovarico regolare con calori silenti, persistenza patologica del CL e di riassorbimento embrionale precoce.

Diversi sono i metodi per effettuare una diagnosi di gravidanza, attualmente i più utilizzati sono: palpazione rettale a partire dai 35 giorni o valutazione ecografica per via transrettale di utero e ovaie dai 24 giorni.

L'identificazione precoce di vacche gravide ma soprattutto non gravide influisce direttamente sull'intervallo parto-concepimento e migliora così l'efficienza riproduttiva. Le bovine che risultano non gravide possono essere trattate per qualsiasi anomalia del tratto riproduttivo scoperta durante la visita, osservate per segni di estro spontaneo o trattate con prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Youngquist, 2007) per favorire il ritorno in estro.

Un metodo ideale dovrebbe rilevare accuratamente la gravidanza prima del primo estro previsto post inseminazione (a circa 21 giorni).

La presente indagine ha l'obiettivo di comparare caratteristiche rilevate clinicamente ed ecograficamente di corpo luteo ciclico e gravidico nelle bovine da latte, tramite visita ginecologica

seguita da rilievo ecografico effettuato a 21 giorni post fecondazione artificiale (FA). Individuare, se presente, una differenza significativa tra il CL e lo “stato di gravidanza”. Infine, identificare la frequenza di determinate caratteristiche rilevabili durante la visita clinico ginecologica in animali gravidi rispetto ai non gravidi.

CAPITOLO 1: L'ANATOMIA E TOPOGRAFIA DELL'APPARATO
RIPRODUTTORE DELLA BOVINA

L'apparato riproduttore femminile è costituito da una struttura tubolare collocata in cavità pelvica e comunicante con l'estero. (Bottarelli, 1989). Esso include tutte le componenti associate alla produzione dell'ocita e al trasporto di esso, nonché le componenti coinvolte nella copula e gestazione. È composto dalle ovaie, gli ovidotti, l'utero, la cervice, la vagina, il vestibolo vaginale e dai genitali esterni. A supporto degli organi genitali interni vi è il legamento largo, costituito da mesovario, mesosalpinge e mesometrio a sostegno rispettivamente di ovaio, ovidotti e utero. Nella vacca, l'utero è bipartito, dunque costituito da due corna uterine, che nel decorso iniziale, sono accostate e unite tra loro dai legamenti intercornuali e poi divergono e si arrotolano a corno d'ariete formando ognuna due curvature a spirale (Bottarelli, 1989) (figura 1).

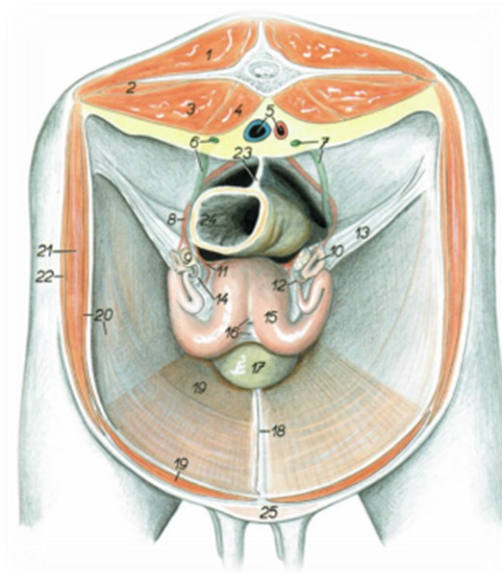


Figura 1: Parte caudale della cavità addominale, in sezione trasversale. Immagine tratta da (Popesko,1997).

1.1. LE GONADI FEMMINILI

Le gonadi femminili sono organi pari. L'ovaio le rappresenta, esso è appeso alla regione lombare ed esplica due funzioni: gametogena, assicurando l'oogenesi, ed endocrina, mediante la secrezione del progesterone (P4) ed estradiolo (E2) (Barone, 2003).

Topografia, forma e dimensioni

Nella specie bovina, durante lo sviluppo embrionale, le gonadi femminili migrano fino alla parete addominale ventrale, cranialmente al *pecten pubis* (König, 2020).

Le ovaie possiedono una forma ovoidale, si presentano appiattite da un lato all'altro e spesso ricordano la forma mandorla. Le dimensioni variano in funzione delle strutture che stanno evolvendo. In media, la lunghezza misura 3,5 – 4 cm, l'altezza 2- 2,5 cm e lo spessore 1,5-2 cm (Barone, 2003).

Il peso dell'ovaio alla nascita è di 1-2 g, di 4-6 g alla pubertà e di una quindicina di grammi nell'adulto in diestro con variazioni estreme di 10 – 20 g. Ovviamente la presenza di grossi follicoli e corpi lutei recenti aumentano nettamente il peso ma in modo variabile e transitorio (Barone, 2003).

Le ovaie sono situate nella parte più caudale della cavità addominale, circa a metà altezza dell'apertura craniale della pelvi (Filotto, 1996).

Esse presentano due facce, un mediale e una laterale, due margini, uno libero e uno mesovarico, e ai poli, l'estremità tubarica e uterina. Il margine mesovarico è in gran parte occupato dall'ilo che riceve un peduncolo vascolare relativamente inspessito (Barone, 2003).

L'ovaio è rivestito dalla borsa ovarica, una sorta di tasca data dall'estensione del mesosalpinge oltre la tuba uterina. La borsa ovarica è ampiamente aperta dal lato ventro-mediale (Barone, 2003).

Rivestito in tal modo lateralmente e cranialmente dal mesosalpinge, l'ovaio è in rapporto medialmente con il corno uterino e con il mesometrio. Inoltre, l'ovaio di sinistra è in rapporto con il fondo cieco dorsale del rumine, mentre l'ovaio destro con le circonvoluzioni del digiuno e talvolta con l'apice del cieco (Barone, 2003)(Figura 2).

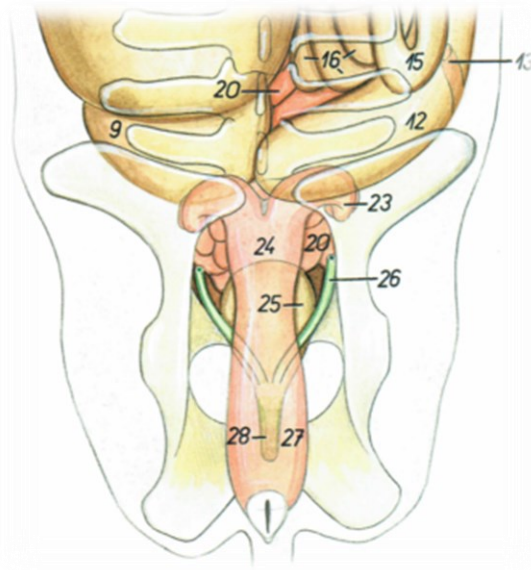


Figura 2: Organi addominali e pelvici della bovina, vista dall'alto. Immagine tratta da (Popesko, 1997).

A livello strutturale, esso si compone di una zona vascolare centrale (midollare) e di una zona parenchimatosa periferica (corticale). L'insieme è rivestito da un epitelio germinativo (cubico semplice) che posa sulla tonaca albuginea, la quale diventa progressivamente più spessa e fibrosa vicino al mesovario, dove si estende il peritoneo. La midollare è la zona vascolare, essa contiene vasi, nervi e fasci di cellule muscolari lisce (Barone, 2003). La zona corticale è costituita da un epitelio germinativo, nel quale sono presenti le strutture funzionali dell'ovaio, i follicoli maturi, atresici ed i corpi lutei e corpi albicanti (König, 2020) (Figura 3 e 4).

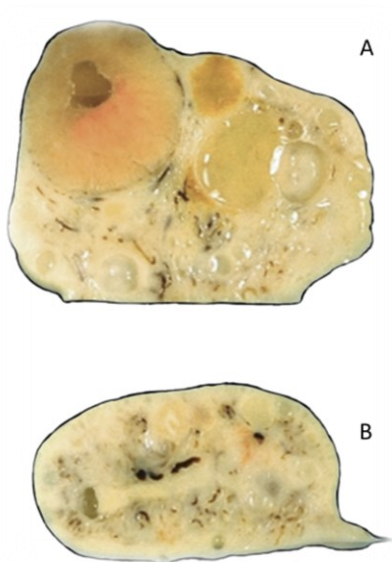


Figura 3: Ovaie di bovina fissate in formalina, sezione longitudinale. L'ovaio A presenta un CL cavitario (sx), un CL regredito (in alto) e follicoli. L'ovaio B ha solo follicoli di piccole dimensioni. (UO Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria - Università di Parma).

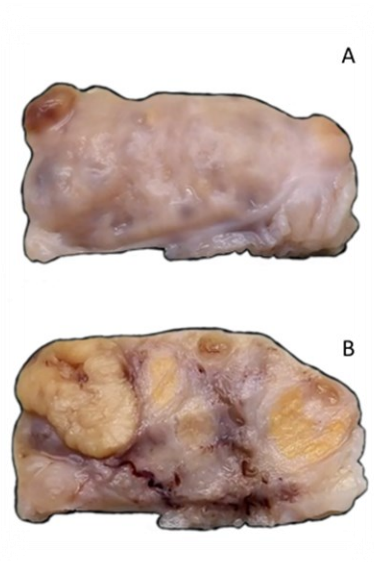


Figura 4: Ovaio di bovina fissato in formalina, visione laterale e sezione trasversale. Nell'immagine B si riconoscono: a sinistra un CL, al centro piccoli follicoli e strutture cicatriziali, a destra un CL in regressione. Nell'immagine A si osserva la zona vascolare con vasi tortuosi che si dirigono verso la zona corticale. (UO Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria – Università di Parma).

Nel corso della gestazione, la topografia varia, infatti dopo il 3° mese di gravidanza, tutto l'apparato genitale, sotto il peso del suo contenuto, si sposta cranio-ventralmente e le ovaie non sono più esplorabili (Bottarelli, 1989)

1.1.1. I FOLLICOLI

Il follicolo ovarico è la struttura che contiene il gamete femminile, attraversa diversi stadi di sviluppo prima di maturare. Nell'animale sessualmente maturo, i follicoli ovarici si sviluppano nella zona corticale dell'ovaio.

L'evoluzione dei follicoli gametogeni passa attraverso una serie di stadi caratteristici che ne ha valso la denominazione in: follicoli primordiali, follicoli primari, follicoli secondari, follicoli terziari, follicoli maturi pre-ovulatori e follicoli involutivi ed atresici (Barone, 2003) (Figura 5).




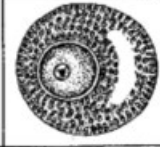
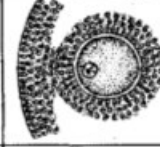
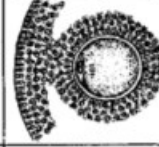
P	PM	PM	S	S	T
					
resting follicle	gonadotrophin independent growth	gonadotrophin independent growth	gonadotrophin dependent growth (secretion of steroids by theca cells)	gonadotrophin dependent growth (secretion of steroids by theca cells)	resumption of meiosis (secretion of steroids by theca and follicle cells)

Figura 5: Classificazione morfologica e fisiologica dei follicoli ovarici: P, follicolo primordiale; PM, follicolo primario; S, follicolo secondario; T, follicolo terziario. Immagine tratta da (Hafez, 2000).

Il follicolo primordiale

Il follicolo primordiale è formato da un unico strato di cellule epiteliali follicolari appiattite, che circondano l'oocita primario. Negli stadi successivi del differenziamento tali cellule si trasformano in cellule della teca interna (König, 2020). I follicoli primordiali sono molto numerosi nel periodo neonatale (circa 300 mila nella vacca). Successivamente molti degenerano e scompaiono e solo un piccolo numero evolve in follicolo primario (Barone, 2003).

Il follicolo primario

il follicolo primario si compone di un oocita primario circondato da un unico strato di cellule follicolari, cubiche e poi prismatiche. I follicoli primari sono vicini alla superficie ovarica, isolati e sparsi (Barone, 2003).

Il follicolo secondario

il follicolo secondario si sviluppa grazie alla proliferazione delle cellule follicolari in corrispondenza di un polo del follicolo. il follicolo secondario è caratterizzato da spazi interstiziali ricchi di liquido. In seguito, questi spazi confluiscono, dando origine all'antro follicolare (König, 2020)

Il follicolo terziario

il follicolo terziario deriva dal precedente per ulteriore accumulo di liquido e per l'ispessimento degli strati interni della parete follicolare. La parete del follicolo terziario è composta da due parti separate da una membrana basale ben distinta. All'interno si trova lo strato granuloso costituito

dalle cellule follicolari che delimitano l'antro e circondano l'oocita, formando il cumulo ooforo. La granulosa, formata da epitelioцитi follicolari, sintetizzano estrogeni e progesterone. Esse possiedono recettori per l'ormone follicolo-stimolante (FSH). Inoltre, le cellule della granulosa esercitano l'azione di inibizione della meiosi. La maggior parte dei follicoli va incontro ad un processo di regressione, chiamato atresia follicolare e degenera. Solo pochi presenteranno un'evoluzione gametogena completa, diventando follicoli maturi (Barone, 2003) (Bottarelli, 1989).

Il follicolo maturo pre-ovulatorio

Il follicolo maturo pre-ovulatorio o follicolo di Graaf, arriva a completa maturazione raggiungendo un diametro di circa 2 cm in un punto casuale della corticale ovarica. Il follicolo maturo presenta modificazioni strutturali ed endocrine che permettono la rimozione del blocco meiotico e la conversione luteinica delle cellule della granulosa, portando alla discesa il follicolo stesso. È costituito dall'antro ripieno di liquido e da una capsula a parete sottile composta da due distinti elementi strutturali: teca interna e teca esterna. La teca interna è formata da cellule di aspetto epitelioide secernenti steroidi. Queste cellule hanno sulla loro membrana recettori per l'ormone luteinizzante (LH); stimulate da questo ormone esse producono androgeni ed estradiolo (Barone, 2003) (Bottarelli, 1989).

Parallelamente al differenziamento dei follicoli ovarici l'oocita attraversa le fasi di divisione e di maturazione meiotica. L'oocita primario termina la prima divisione meiotica durante la fase di maturazione pre-ovulatoria, mentre la seconda divisione meiotica si completa nella tuba uterina, in seguito alla fecondazione, con la penetrazione dello spermatozoo nella cellula uovo.

I follicoli involutivi e atresici

Sono circa il 90% dei follicoli la cui evoluzione non produce un uovo fecondabile (Sjaastad, 2003). Sono presenti costantemente in tutte le ovaie e contribuiscono al normale funzionamento della gonade. La regressione può iniziare a qualsiasi stadio dell'evoluzione gametogena. Nei soggetti giovani, molti follicoli primordiali e primari degenerano. Quando l'involutione colpisce follicoli terziari si parla di atresia follicolare. I "follicoli atresici" sono formazioni, in cui la struttura follicolare è degenerata e sostituita da materiale fibro-ialino, sono destinati ad essere riassorbiti. I "follicoli cistici" invece sono follicoli cavitari che ritardano l'involutione e accrescono il loro volume, nonostante ciò, esitano anch'essi nell'atresia (Barone, 2003).

1.1.2. IL CORPO LUTEO

Il corpo luteo (CL), è una ghiandola endocrina che si sviluppa dalla parete di un follicolo ovarico dopo l'ovulazione, in assenza di gravidanza è transitorio, mentre in seguito al concepimento resta attivo per un determinato periodo di tempo (Barone, 2003). Nel primo caso si parla di corpo luteo ciclico, nel secondo di corpo luteo gravidico. La sua funzione principale è la secrezione di progesterone (P4), essenziale per il mantenimento della gravidanza. Il corpo luteo è formato da tessuto omogeneo, compatto ed elastico di colore arancione per la presenza di carotenoidi, pigmenti che ne conferiscono la tipica colorazione (Bottarelli, 1989).

La formazione del corpo luteo

Al momento dell'ovulazione, il follicolo diminuisce di volume e la sua parete si ripiega, mentre la cavità si riempie di essudato sierofibrinoso che coagula. Successivamente avviene un'abbondante neoformazione di capillari nella teca interna, che invadono lo strato granuloso. Le cellule dello strato granuloso sono ricche di recettori per l'LH, si moltiplicano e si ingrandiscono. Le cellule follicolari, che continuano a moltiplicarsi, diventano poliedriche trasformandosi in luteociti e secernono il progesterone (Barone, 2003).

In questo primo periodo il coagulo viene infiltrato di sangue, assumendo un aspetto sanguinolento e color rosso scuro, divenendo così "corpo emorragico" (Barone, 2003).

In seguito, la parete si ispessisce e si sviluppa verso il centro formando grosse pieghe di tessuto ghiandolare.

Il corpo luteo è formato da due tipi di cellule luteali, che si distinguono per diverse dimensioni. Nelle vacche non gravide, i microluteociti hanno un diametro tra i 10-20 μm e derivano dalla teca interna del follicolo. I macroluteociti hanno un diametro di 25 μm e derivano dalle cellule della granulosa. Nelle vacche gravide, i macroluteociti contengono numerosi granuli che secreti per esocitosi, rilasciano ormoni peptidici come l'ossitocina, relaxina e neurofisina (Fields, 1996). All'interno del citoplasma dei luteociti sono presenti numerose inclusioni lipidiche che si caricano di un pigmento carotenoide, "la luteina", che conferisce al corpo luteo la tipica colorazione ocra o arancio (Barone, 2003) (Milvae, 1996).

Il CL è un organo altamente vascolarizzato. La vascolarizzazione è essenziale per lo sviluppo e mantenimento della ghiandola e per il trasporto degli ormoni da essa prodotti.

Una volta formatasi, la vascolarizzazione si mantiene per un periodo limitato nello stato di non gravidanza. Nella bovina, il CL è composto da un gran numero di cellule endoteliali vascolari, che rappresentano fino al 50% del CL. Dal punto di vista funzionale, i vasi sanguigni luteali possono essere classificati approssimativamente in due tipi: vasi arteriolo-venosi (cioè arteriola, diametro ~40 μm) e vasi venulari (diametro ~30 μm), che hanno uno strato di muscolatura liscia; e vasi capillari, che non hanno uno strato di muscolatura liscia (Shirasuna, 2012) (Figura 6).



Figura 6: Processo di formazione del CL. A sx: un corpo emorragico ripieno di liquido sieroso; al centro: la parete del corpo emorragico ispessita e con pieghe concentriche; a destra: un CL giovane, il cui tessuto luteinico aumenta rapidamente il volume occupando la cavità centrale. (UO Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria – Università di Parma).

La fase di regressione del corpo luteo

In assenza di gravidanza, a partire dal 15°- 16° giorno del ciclo, il CL subisce una regressione morfologica e funzionale, chiamata luteolisi, caratterizzata dalla cessazione della produzione di progesterone (P4) e dalla degenerazione delle componenti cellulari, contemporaneamente alla riduzione dei vasi sanguigni. La luteolisi è conseguenza dell'attività della prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$), prodotta dalle ghiandole dell'endometrio, che vengono drenate attraverso la vena uterina e convogliate all'ovaio ipsilaterale passando per diffusione controcorrente nell'arteria utero-ovarica (Maffeo, 1992). Per effetto della $\text{PGF}_{2\alpha}$, le pareti vascolari vanno incontro ad ipertrofia e restringono il lume vascolare fino ad obliterarlo (Liebich, 2012).

I luteociti, privati dell'apporto ematico, vanno incontro ad accumulo lipidico, i granuli aumentano di volume e la luteina diventa abbondante. Parallelamente, la ghiandola viene invasa da tessuto connettivo e il suo parenchima scompare. Il CL regredito può assumere differenti colorazioni (Liebich, 2012). Il CL si retrae verso l'interno dell'ovaio, diventa fibroso o fibro-ialino (*corpus albicans*) e persiste nel ciclo successivo per poi scomparire (Barone, 2003)(Figura 7).

Se si instaura la gravidanza, il corpo luteo persiste, aumentando lo sviluppo della trama connettivale e vascolare.

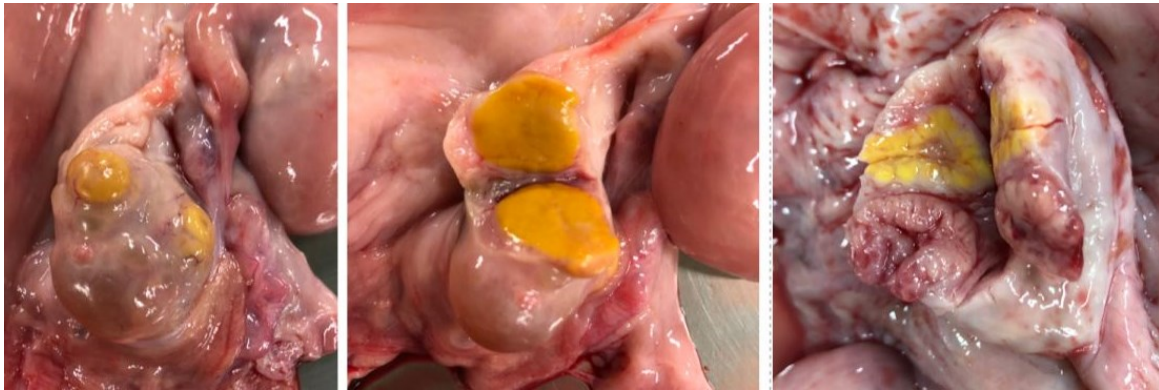


Figura 7: A sinistra, ovaio con presenza di follicoli di varie dimensioni, e due CL in regressione di color giallo ocra. Al centro, sezione di CL color giallo ocra in regressione. A destra, ovaio con due CL, il primo giallo limone in regressione e il secondo rosa pallido, CL in formazione. (UO Patologia Generale e Anatomia Patologica Veterinaria – Università di Parma).

1.2. IL TRATTO GENITALE

La tuba uterina

Le tube uterine, salpingi o ovidutti sono organi pari, con capacità contrattile, caratterizzati da un esile lume, che presentano un decorso tortuoso nella mesosalpinge da cui sono sostenute (König, 2020). Esse costituiscono la parte iniziale delle vie genitali della femmina, ricevendo gli oociti liberati dall'ovaio omolaterale (Barone, 2003). Le tube uterine sono composte da tre parti, ognuna con una funzione specifica: l'infundibolo, che mediante le fimbrie cattura l'oocita, l'ampolla dove generalmente ha luogo la fecondazione e l'istmo che conduce lo zigote fino all'apice del corno uterino, attraverso l'ostio uterino della tuba uterina (König, 2020).

L'utero

L'utero è un organo muscolo-membranoso cavo che accoglie il *conceptus* e ne permette lo sviluppo fino al momento del parto. Nella bovina l'utero è bipartito, costituito dunque da due corna, il corpo e il collo (o cervice). L'utero sporge nella cavità addominale ma una piccola parte di corpo e cervice si trovano in cavità pelvica (König, 2020)(Figura 8).

Le corna hanno una lunghezza che varia dai 35 a 45 cm, inizialmente sono unite per una lunghezza di circa 10 cm da un perimetrio comune, ma le cavità permangono divise da un setto mediano. Le basi delle corna si affiancano per un lungo tratto e sono unite dai legamenti intercornuali (ventrale e dorsale). Le corna sono incurvate a spirale (corni d'ariete), con un margine libero

convesso ed il margine mesovarico, concavo. Gli apici divergenti si uniscono progressivamente alle tube uterine. Il corpo dell'utero è breve e poco distinguibile, misura 3-4 cm (König, 2020).

L'utero e le corna uterine sono costituiti da tre strati: sierosa, muscolare (miometrio) e mucosa (endometrio). La sierosa peritoneale presenta delle pliche longitudinali, molto evidenti negli animali più anziani ed esse scompaiono durante la gravidanza. Il miometrio è costituito da due strati di muscolatura liscia, uno interno trasversale e uno esterno longitudinale. L'endometrio è costituito da pliche e caruncole. Le caruncole sono strutture ovali del diametro di 1,5 cm; dopo il parto presentano una depressione centrale. Esse sono circa un centinaio disposte su 4 fila irregolari.

La cervice (o collo), mette in comunicazione l'apparato genitale esterno con quello interno. È costituita da un manicotto tubulare cilindrico, duro e membranoso ma mobile. Nelle manze è lungo 7-10 cm e ha un diametro di 2-3 cm, ma le dimensioni aumentano con i parti e durante la gravidanza. È situata in cavità pelvica, parallelamente al retto e dunque facilmente palpabile. La cervice comunica con la cavità vaginale mediante l'ostio cervicale vaginale, quest'ultimo è beante durante il calore, mentre è ristretto nelle altre fasi del ciclo estrale. Dopo il terzo mese di gravidanza viene chiuso da un tappo di muco denso che persiste fino al parto. La cervice è attraversata dal canale cervicale fino all'ostio cervicale uterino. Il lume del canale cervicale è stretto e rivestito da mucosa ghiandolare e da una muscolatura circolare che forma 3 o 4 pliche anulari a forma di spirali falciformi poste trasversalmente (Bottarelli, 1989)(Figura 8).

La vagina

La vagina è l'organo copulatore femminile. È un organo cavo, cilindrico, lungo circa 30-40 cm che si estende dall'ostio cervicale esterno fino all'ostio esterno dell'uretra (König, 2020). È collocata in cavità pelvica, in rapporto dorsalmente con il retto e ventralmente con la vescica. Le pareti sono formate da una membrana muscolo-membranosa elastica, con pieghe longitudinali e trasversali, rivestite da mucosa ghiandolare (König, 2020)(Figura 8).

Il vestibolo della vagina inizia in corrispondenza dello sbocco dell'uretra, dove è presente un'estroflessione ventrale (diverticolo suburetrale). La mucosa vestibolare presenta le ghiandole vestibolari e il corpo del clitoride (König, 2020).

La vulva

È un organo genitale esterno, costituito da due labbra simmetriche, piatte, di cute morbida pieghettata, bianca o pigmentata. Le labbra delimitano la rima vulvare e terminano dorsalmente con la commessura vulvare perineale e ventralmente con la commessura vulvare ventrale, appuntita e provvista di un ciuffo di peli lunghi. Durante l'estro le labbra diventano umide, edematose e la pelle lucida e untuosa (Bottarelli, 1989)(Figura 8).

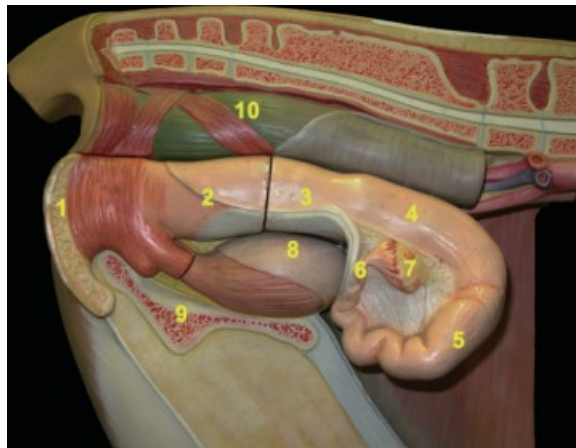


Figura 8: Anatomia del tratto riproduttivo della bovina, sezione trasversale. 1: Vulva; 2: Vagina; 3: Cervice; 4: Corpo dell'utero; 5: Corno uterino di destra; 6: Ovidotto; 7: Ovaio; 8: Vescica urinaria; 9: osso Ischiatico; 10: Retto. Immagine presa da (Colloton, 2021)

CAPITOLO 2: LA DINAMICA OVARICA

La pubertà è il momento in cui l'animale acquisisce la capacità di riprodursi poiché possiede le strutture che garantiscono la ciclicità del ciclo estrale, nella bovina inizia tra gli 8-10-12 mesi di età. Nel periodo impubere, le ovaie presentano sulla loro superficie follicoli a diversi stadi di sviluppo, che regrediscono senza mai giungere al follicolo pre-ovulatorio. Al raggiungimento della maturità sessuale le ovaie sono in grado di rispondere efficacemente alla stimolazione delle gonadotropine ipofisarie (LH, FSH) con la produzione di oociti maturi ed ormoni steroidei (Maffeo, 1992). Durante la gestazione, le ovaie presentano il CL gravidico e follicoli non maturi (Noakes, 2018).

2.1. LE FASI DEL CICLO ESTRALE

L'attività ciclica ovarica nella bovina è presente tutto l'anno, perciò viene definita come animale poliestrale non stagionale (De Rensis, 1998).

Il ciclo estrale rappresenta l'andamento ciclico dell'attività ovarica. La durata normale di un ciclo estrale nelle bovine è di 21 giorni ma può variare nell'intervallo di 18-24 giorni. Il ciclo è costituito da due fasi distinte: la fase luteale, comprensiva di metaestro e diestro e la fase follicolare composta da proestro ed estro (Crowe, 2022). Ad ogni fase del ciclo estrale corrispondono una serie di modificazioni cicliche dell'apparato genitale e comportamentali (Maffeo, 1992).

2.1.1. IL METAESTRO

Il metaestro che ha durata di 3-4 giorni, segna l'inizio della fase luteinica. Avvenuta l'ovulazione, il follicolo collassa dando origine al corpo emorragico. Il corpo emorragico diviene rapidamente corpo luteo. Dopo 48 ore dall'ovulazione raggiunge il diametro di circa 1,4 cm. In questa prima fase al tatto è molle e cedevole, alla vista ha colore crema opaco ed in sezione presenta pieghe concentriche (Noakes, 2018).

In questa fase è ancora presente il corpo luteo del ciclo precedente in fase di regressione che può essere confuso per il CL funzionante, bensì presenti una consistenza dura (Sali, 2013).

Subito dopo la rottura del follicolo il tasso ematico dell'LH cala rapidamente e ciò comporta la riduzione delle secrezioni del tratto genitale e l'utero appare edematoso e rilassato. È possibile notare uno scolo ematico, causato da emorragie petecchiali delle caruncole uterine tra le 24-48 ore dopo l'estro (Sali, 2013).

Durante il metaestro il tasso ematico di tutti gli ormoni sessuali è minimo (estrogeni < 5pg/ml; progesterone, FSH, LH <2ng/ml) (Bottarelli, 1989).

2.1.2. IL DIESTRO

È la fase di attività del CL dominata dal progesterone (P4). Dura circa 16 giorni (dal 4° giorno al 17°- 18° giorno) e termina con la regressione del CL. Dalla proliferazione delle cellule della tecca interna, si forma il CL che si sviluppa fino a raggiungere il diametro di 2-3 cm, all'8° giorno del ciclo (Bottarelli, 1989). In questa fase per effetto del progesterone prodotto, l'utero appare flaccido, la cervice si chiude, le ghiandole uterine diventano ipertrofiche e la mucosa uterina pallida (Sali, 2013).

In particolare, il CL diviene compatto e di colore giallo o giallo-arancio con una forma ovale, quadrata o rettangolare. Il CL può svilupparsi all'interno del parenchima ovarico o può sporgere dalla superficie, formando una protuberanza di circa 1 cm di diametro, ben definita, conferendogli l'aspetto di "CL a fungo" (Noakes, 2018).

In contemporanea, avviene lo sviluppo follicolare che però si interrompe allo stadio di follicolo terziario. Questi follicoli non arrivano mai a maturazione ma diventano atresici e scompaiono senza lasciare traccia (Bottarelli, 1989).

2.1.3. IL PROESTRO E L'ESTRO

La fase proestrale precede l'estro, dura circa 3 giorni ed è caratterizzata dalla regressione del CL. Inizia al 18° giorno fino al 20° del ciclo, ma già a partire dal 16° giorno la PGF_{2α} prodotta nel corno uterino e pervenuta per via breve all'ovaio corrispondente determina costrizione dei vasi capillari del CL il quale, in 12-24 ore, cessa la produzione di progesterone, il cui tasso ematico cade a 1ng/ml e a 2ng/ml nel latte (Bottarelli, 1989). Mediante una cascata endocrina, la caduta di progesterone stimola la liberazione di FSH e di conseguenza la maturazione del follicolo. Il follicolo pre-ovulatorio, attorno al 18° giorno, secerne estrogeni aumentandone la concentrazione ematica e nell'urina. Tale concentrazione è mantenuta fino ai primi segni visibili dell'estro o calore (Bottarelli, 1989).

La fase estrale o di calore, è caratterizzata da modificazioni anatomico-funzionali dell'apparato genitale e dalla comparsa di manifestazioni comportamentali esterne, in cui l'ovulazione avviene verso la fine delle stesse manifestazioni (Sali, 2013). Per l'ottimale gestione della fertilità della

mandria è fondamentale l'identificazione e il riconoscimento delle bovine in estro. La durata è di 15 (\pm 6) ore. All'inizio dell'estro il progesterone scende ai livelli minimi raggiungendo la concentrazione ematica di 0,1 ng/ml e di 0,3-3,0 ng/ml nel latte. Anche gli estrogeni raggiungono il loro picco a 4 ore prima dell'ovulazione agendo a livello ipotalamico, attivando i circuiti nervosi encefalici che determinano manifestazioni comportamentali tipiche del calore e stimolando la liberazione di GnRH che a sua volta provoca il rilascio ipofisario di LH per la durata di 7-8 ore con picco plasmatico a metà calore, dando inizio alla luteinizzazione (Bottarelli, 1989).

Durante l'estro la mucosa è congesta ed iperemica, le ghiandole uterine secernono una maggior quantità di muco. La cervice è distesa e aperta, la muscolatura uterina è contratta e le corna sono avvolte a spirale e interamente contenute nella pelvi e l'ovaio presenta il follicolo preovulatorio (Noakes, 2018) (Sali, 2013).

A metà dell'estro il CL preesistente si presenta ridotto a 1,5 cm di diametro e la sua protrusione diviene piccola e meno distinta. Il CL in regressione assume colore giallo vivo e consistenza dura (Noakes, 2018).

LE ONDATE FOLLICOLARI

La crescita dei follicoli ovarici nelle bovine segue un andamento a onde distinte durante il ciclo estrale, durante la gravidanza e in determinate condizioni di anaestro. Solo in presenza di FSH (ormone follicolo stimolante) i follicoli sono reclutati all'interno di una "coorte", sfuggendo all'apoptosi ed entrando a far parte attivamente di un'onda di crescita follicolare (Aerts, 2010).

Circa l'80% delle vacche da latte possiede un ciclo a due ondate follicolari, mentre l'80% delle bovine da carne ha tre ondate di crescita follicolare (Adams, 2008). Ogni ondata follicolare ha una durata che va dai 6 ai 12 giorni a seconda che si tratti di due o tre ondate per ciclo e dipendentemente dalla durata del ciclo. L'emergere di una nuova ondata follicolare è supportato da un aumento transitorio di FSH.

Subito dopo l'ovulazione del follicolo preovulatorio, si ha un picco di FSH che permette il reclutamento variabile di follicoli coortali (Adams, 2008) (Aerts, 2010). Il picco di FSH è massimo dopo circa 48 ore dall'inizio dell'estro. I follicoli reclutati alla partenza di ogni nuova ondata follicolare hanno un diametro di circa 3-5 mm. Nelle prime 48 ore l'andamento di crescita è lo stesso per tutti i follicoli, ma successivamente varia, un gruppo di follicoli cresce più degli altri e di questo uno o più (in caso di codominanza) cresce con un ritmo maggiore (Adams, 2008).

I follicoli in crescita producono estrogeni ed inibina determinando la soppressione della liberazione di FSH, nonostante la loro crescita dipenda da questo ormone. Solamente i follicoli di almeno 5 mm di diametro acquisiscono la capacità di inibire il rilascio di FSH (Gibbons, 1999).

Al 4° giorno dopo l'ovulazione, il follicolo di maggiore diametro devierà rispetto agli altri follicoli, diventando il follicolo dominante (FD) (Adams, 2008). Il follicolo dominante ha un diametro circa di 8 mm, diametro minimo per garantire un adeguato numero di recettori per LH a livello di cellule della granulosa (Ginther, 1989). Nelle bovine a due ondate di crescita, la partenza della seconda ondata si ha tra l'8° e il 9° giorno dall'ovulazione, mentre la terza ondata si ha tra il 15° e 16° giorno (Adams, 2008).

Il FD inibisce la crescita degli altri follicoli che hanno partecipato alla prima ondata, attraverso la produzione di inibina, un ormone glicoproteico che ha una duplice azione: localmente limita la trasformazione degli androgeni in estrogeni promuovendo l'apporto di androgeni all'interno del FD; a livello periferico bloccando la secrezione di FSH, inducendo quindi la regressione dei follicoli subordinati (Gnemmi G. M., 2007). Il livello di FSH rimane basso nei due giorni successivi alla deviazione del FD, per poi risalire, fino al nuovo picco al termine della dominanza a cui seguirà una nuova onda di crescita follicolare (Adams, 2008).

Il numero delle ondate follicolari ha una sua importanza pratica qualora si ricorra ad esame ultrasonografico di gravidanza precoce, che non si basi sull'identificazione dell'embrione ma soltanto sulla presenza di fluido all'interno dell'utero. In questi animali si potrebbe confondere uno stato di proestro con una gravidanza (Sali, 2013).

2.2.CONFRONTO TRA ATTIVITÀ DEL CORPO LUTEO CICLICO E GRAVIDICO

La funzione principale del CL è la produzione di progesterone. Questo ormone è fondamentale per la durata del ciclo estrale e per il successo della gravidanza. La concentrazione sierica di P4 mima i cambiamenti fisici del CL (Noakes, 2018).

È stata indagata la correlazione tra dimensioni del CL e concentrazioni plasmatiche di P4 ed è emerso che peso e concentrazione plasmatica di progesterone aumentano tra il 5° e l'8° giorno. Tra l'8° e il 16° giorno aumenta ulteriormente la concentrazione plasmatica ma resta costante il peso del CL. Questo potrebbe indicare un ulteriore sviluppo a livello microscopico che però non influisce nelle dimensioni complessive della ghiandola (Mann, 2009).

Attorno al 17°-18° giorno, il rilascio pulsatile di $\text{PGF}_2\alpha$ da parte dell'utero innesca la luteolisi, che si manifesta con un drastico calo del progesterone e riduzione delle dimensioni del CL e del flusso ematico (Shirasuna, 2012).

Al contrario, il corpo luteo gravidico persiste in seguito al riconoscimento materno di gravidanza, bloccando il meccanismo luteolitico (Noakes, 2018). La persistenza del CL è essenziale per mantenere elevata la concentrazione di progesterone che nella specie bovina è prodotto solo in minima parte dalla placenta (Noakes, 2018). La concentrazione di P4 nel latte e nel sangue aumenta nei primi giorni di gravidanza fino a raggiungere il picco tra il 20°-21° giorno, a cui segue una breve caduta, per poi mantenersi costante fino al 260° giorno di gravidanza (Richter & Gotze, 1986).

Il progesterone esercita un meccanismo di feedback negativo, riducendo la secrezione basale di GnRH da parte dell'ipotalamo, impedendo la maturazione follicolare, l'ovulazione e le manifestazioni estrali (Noakes, 2018). Di conseguenza il mancato ritorno in calore dopo 21 giorni (generalmente), persistenza del CL, alto livello di P4 dovrebbero essere segni di gravidanza (Figura 9).

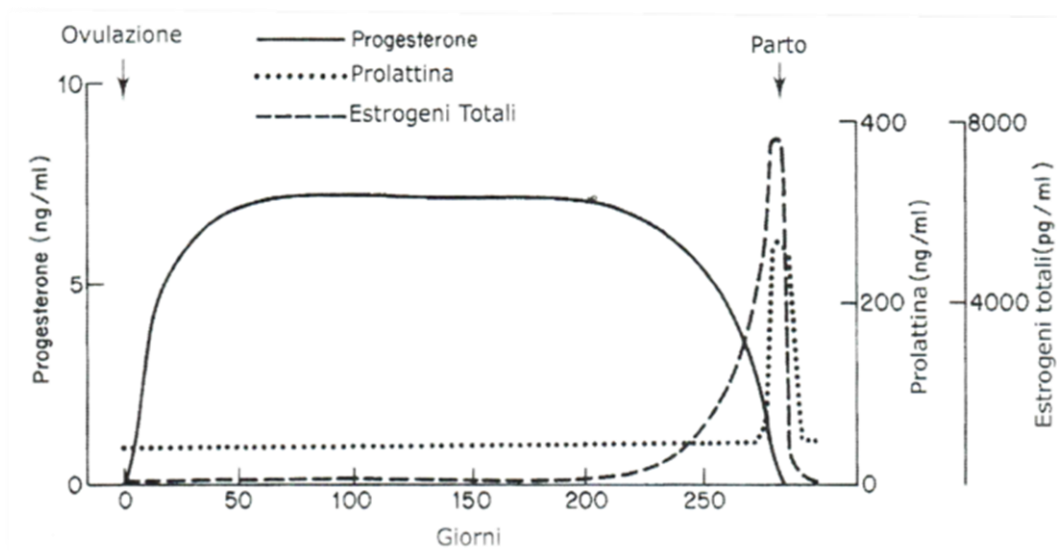


Figura 9: Andamento delle concentrazioni ormonali nel circolo periferico della bovina durante la gravidanza. Immagine tratta da (Noakes, 2018).

CAPITOLO 3: LA VISITA CLINICO GINECOLOGICA

La visita clinico ginecologica è fondamentale nell'allevamento dei bovini da latte per accertare in modo preciso condizioni fisiologiche o patologiche dell'apparato riproduttore. È la premessa per qualunque intervento di corretta gestione dell'attività riproduttiva della bovina e di conseguenza dell'intera mandria (Sali, 2013).

È utile per diagnosticare lo stato di maturità sessuale della manza e l'attitudine ad essere fecondata, lo stato di gravidanza o meno, le fasi del ciclo estrale e in particolare il calore, disturbi del ciclo, patologie a carico di ovaie e tratto genitale (Sali, 2013). In seguito ad una diagnosi accurata, potranno essere svolti interventi correttivi o terapeutici a livello di singolo o a livello di mandria.

la visita clinica ginecologica si basa sull'anamnesi, esame esterno ed esame interno.

Un' anamnesi dettagliata e precisa è essenziale per proseguire nell'esame interno ed esterno. È costituita da anamnesi collettiva ed individuale.

L'anamnesi collettiva comprende situazioni ambientali, tipo di stabulazione, clima, alimentazione, conduzione manageriale, malattie contagiose superate o in corso, percentuale di ritenzioni placentari, parametri di fertilità media dell'allevamento, metodi di fecondazione, produzione media di latte, patologie podali, indici di fertilità e programmi vaccinali (Bottarelli, 1989).

L'anamnesi individuale considera il numero di parti, data dell'ultimo parto, tipo di parto, fertilità negli anni precedenti, produzione di latte, malattie superate, puerperio, malattie puerperali, data primo calore dopo il parto, numero fecondazioni dopo il parto, tipo di fecondazione, cicli estrali, calori, perdite vaginali durante estro e diestro (Bottarelli, 1989).

L'esame esterno comprende una rapida ispezione esterna dell'animale che ci si accinge a visitare. Viene effettuata una valutazione visiva di body condition (BCS), ispezione visiva delle regioni adiacenti ai genitali (segni di cavalcamento sulla groppa, rilassamento dei legamenti sacro-ischiatici, tracce di sangue, muco o essudati su perineo e coda e fuoriuscita di muco, sangue, pus dalla vulva). Inoltre, viene valutato l'edema, arrossamento e umidità delle labbra vulvari (Sali, 2013).

Infine, viene effettuato l'esame interno tramite speculum vaginale (pratica poco utilizzata a causa della maggiore quantità di tempo richiesta e del pericolo di contaminazione fecale) e mediante palpazione rettale.

La palpazione rettale costituisce il classico metodo di indagine clinica dell'apparato riproduttore. La vacca da esaminare deve essere adeguatamente contenuta e mediante l'utilizzo di guanti monouso, il veterinario penetra con la mano a cono attraverso l'ano nel retto. Dopodiché, la vacca viene svuotata dal materiale fecale e mediante una palpazione delicata, attenta e veloce vengono ispezionati i tratti dell'apparato genitale e le ovaie. La palpazione dell'apparato genitale si esegue in ordine caudo-craniale (Bottarelli, 1989).

La struttura guida per il reperimento di utero e ovaie è la cervice. La cervice viene riconosciuta come una formazione consistente, più piccola nelle manze, dello spessore di 2-7 cm e lunga 6-10 cm. Normalmente è mobile in tutte le direzioni, ad eccezione di gravidanza oltre i 70 giorni, aderenze, mummificazione/macerazione fetale, ascessi nel bacino, formazioni tumorali o piometra/mucometra abbondante (Sali, 2013). La cervice, nelle fasi di proestro ed estro presenta alti livelli di recettore dell'ormone follicolo-stimolante (FSH-R), il quale venendo attivato, induce una serie di reazioni a cascata che esitano nel rilassamento della sua muscolatura e nell'apertura dell'ostio cervicale durante queste fasi (Shemesh M, 2001). Dunque, durante l'estro la cervice risulta, iperemica, aperta e talvolta da essa può fuoriuscire un muco chiaro e abbondante. Durante le altre fasi del ciclo estrale e con l'avvento della gravidanza, la cervice è chiusa e dopo il 3° mese di gravidanza si forma un tappo mucoso giallastro che permane fino al momento del parto.

Proseguendo con il braccio cranialmente si palpa il corpo dell'utero e si giunge dorsalmente al legamento intercornuale, che può venire afferrato e mediante trazione riportare l'utero nella pelvi. Alla palpazione, solitamente l'utero (vuoto) risponde contraendosi. Mediante l'esplorazione di quest'organo si mira a valutare grandezza e simmetria delle corna uterine, consistenza e spessore delle pareti, contrattilità dell'organo (tono), mobilità nel cavo pelvico e addominale ed eventuale contenuto patologico. Nella bovina in calore l'utero è turgido, molto tonico e ben reattivo. In situazioni patologiche, può apparire più o meno ingrossato, con essudato, la consistenza è pastosa e risulta meno reattivo alla palpazione (Sali, 2013). Nella fase luteinica del ciclo è flaccido, morbido e disteso.

Le corna uterine vengono valutate insieme, si porta la mano distesa in corrispondenza delle grandi curvature e si piegano le dita in modo da poter palpare contemporaneamente la parte dorsale e mediana e valutarne volume, simmetria e contenuto. Il volume varia a seconda dell'età dell'animale e del numero di parti. La simmetria delle corna è indicativa di una buona involuzione uterina nel post-parto. Al contrario, l'asimmetria delle corna 30 giorni dopo il parto denota ritardata e insufficiente involuzione uterina o presenza di patologie come l'endometrite. L'asimmetria con fluttuazione per presenza di liquido è presente nella gravidanza di oltre 40 giorni. Una lieve asimmetria è fisiologica nelle vacche pluripare (Bottarelli, 1989).

La valutazione delle salpingi è solitamente impossibile, poiché in condizioni di normalità esse non sono palpabili. Eventuali ispessimenti sono indicativi di stati patologici.

Dopo aver esaminato i diversi segmenti del tratto genitale si procede all'apprezzamento delle ovaie, per accertarne lo stato funzionale ed eventuali patologie in atto. Nei soggetti giovani, le ovaie sono situate a circa un palmo dalla linea mediana sul pavimento del bacino, mentre nei soggetti adulti cinque dita cranialmente al margine craniale del pube, in corrispondenza di esso o più ventralmente. Ogni ovaia viene valutata singolarmente per quanto concerne: dimensioni, caratteristiche e forma della superficie (liscia, rilievi o infossamenti), consistenza generale (molle, soda, dura), mobilità passiva e formazioni funzionali (follicoli, cisti e corpi lutei) (Sali, 2013). Le ovaie normalmente funzionanti presentano in tutte le fasi del ciclo vescicole palpabili e un corpo luteo più o meno sviluppato. Durante il periodo preovulatorio, alla palpazione trans-rettale, il follicolo maturo viene percepito come una protuberanza liscia a cupola soda e ripiena di liquido. Alla fine del calore e fino alla rottura, il follicolo diventa flaccido e molle e cede sotto la pressione digitale e può involontariamente rompersi (Bottarelli, 1989). È possibile percepire follicoli a vario stadio accanto a un corpo luteo ben sviluppato. La presenza di una vescicola tra i 1,5 cm e 2 cm sull'ovaio (accanto ad un corpo luteo in regressione) può essere riferita ad un follicolo da calore solo quando contemporaneamente l'utero presenta un aumento del tono e della contrattilità e l'ostio cervicale risulta aperto (Sali, 2013).

Talvolta è possibile reperire sull'ovaio le cosiddette cisti ovariche. Le cisti ovariche sono strutture patologiche rappresentate da uno spazio ripieno di liquido di diametro maggiore a 25 mm. Si differenziano dai follicoli poiché persistono per più di 10 giorni e l'ovaio cistico non presenta corpi lutei (Hanzen, 2000). Le cisti ovariche possono essere follicolari o luteiniche. Alla palpazione transrettale le cisti follicolari hanno una parete sottile, sono fluttuanti e possono rompersi

durante la manipolazione. Le cisti luteali, invece, hanno una parete più spessa costituita da tessuto luteale, che le fa sentire più solide. La diagnosi differenziale tra un corpo luteo con cavità e una cisti luteale può basarsi sui seguenti criteri:

- la lacuna del corpo luteo ha solitamente un diametro inferiore a 25-30 mm;
- lo spessore del tessuto luteale circostante varia da 5 a 10 mm;
- la cavità di una cisti luteale è solitamente regolare e spesso presenta alcune sottili linee bianche (trabecole);
- il bordo del tessuto luteale è meno regolare di quello di un follicolo (Pieterse, 1989);
- il tessuto luteale è solitamente più largo della cavità.
- la lacuna del corpo luteo tende a regredire dopo il 10° giorno del ciclo estrale (Kastelic, 1990).

Dopo l'ovulazione, durante il metaestro, il follicolo collassato è palpabile come una depressione di circa 1 cm rilevabile manualmente che viene successivamente riempita dal CL. Il corpo emorragico (corpo luteo giovane, in via di sviluppo) è presente dal 1° al 5° giorno. È piuttosto difficile da identificare, soprattutto nelle fasi iniziali. È possibile percepire una papilla morbida di altezza inferiore ad 1 cm, crepitante, che può essere differenziata da un follicolo perché la sua superficie è meno solida e liscia e di dimensioni minori di un follicolo maturo o di un CL maturo. (Hanzen, 2000). Durante il diestro, il CL maturo raggiunge le dimensioni massime di 2-3 cm tra il 6° e il 18° giorno di ovulazione. La maggior parte del CL si approfonda nell'ovaio ed ha una forma ovale, segue in corrispondenza della superficie ovarica un restringimento o "colletto" con un avvallamento al centro. Il CL mantiene la massima dimensione fino al 19° giorno del ciclo, tra il 19° e 21° giorno ha inizio la sua regressione, la parte sporgente si fa piramidale e dura, il diametro si riduce ad 1 cm durante il calore del ciclo successivo e a 0,5 cm dopo 2 giorni dal calore e non sporge sulla superficie. Al termine del metatesto il CL è scomparso.

In caso di gravidanza, il CL permane e viene denominato CL gravidico. Esso equivale per dimensioni e funzione al CL ciclico nella fase di massima attività (Richter & Gotze, 1986). Il CL gravidico raggiunge il massimo sviluppo a 90 giorni di gravidanza e nella specie bovina si mantiene fino a 6 mesi, dopodiché inizia la regressione che termina solo dopo il parto (Richter & Gotze, 1986) (Filotto, 1996). Il CL gravidico tende a perdere il colletto e l'ombelicatura, per cui alla palpazione risulta essere più arrotondato e liscio rispetto al CL ciclico (Hanzen, 2000).

3.1. DIAGNOSI DI GRAVIDANZA PRECOCE MEDIANTE PALPAZIONE RETTALE

L'accertamento della gravidanza, eseguito come routine più precocemente possibile è indispensabile per una buona conduzione dell'allevamento delle bovine da latte. Permette di escludere con certezza lo stato di eventuale gravidanza, consentendo l'applicazione di interventi terapeutici che altrimenti provocherebbero l'aborto (Bottarelli, 1989). Inoltre, le vacche "open" (non gravide) aumentano i costi di mantenimento della mandria e non forniscono reddito all'allevatore. L'ideale sarebbe avere un metodo diagnostico che identifichi le vacche gravide e quelle "open" prima del successivo estro previsto (circa 21 giorni), minimizzando così l'intervallo parto-concepimento.

Attualmente esistono tre metodi affidabili per diagnosticare lo stato di gravidanza di una vacca: la palpazione transrettale, l'ecografia transrettale e i test endocrini.

Di questi metodi la palpazione transrettale è il più comunemente utilizzato. Questo metodo, accompagnato da una buona conoscenza delle fasi della gravidanza e dello sviluppo fetale, consente all'operatore di stimare precisamente lo stadio della gravidanza. Con molta pratica e conoscenza, si possono ottenere risultati coerenti, con accuratezza prossima al 100% già dal 30°-35° giorno di gravidanza. Inoltre, è necessario considerare che la frequenza di morte embrionale precoce nei bovini è elevata nei primi mesi di gestazione; pertanto, vacche diagnosticate come gravide precocemente hanno maggiori probabilità di tornare in estro e di essere diagnosticate non gravide all'esame di conferma. Questo interferisce sull'accuratezza dei metodi diagnostici (Youngquist, 2007).

La diagnosi definitiva di gravidanza si basa sull'identificazione di strutture presenti solo se l'animale è gravido. Le quattro strutture facilmente palpabili sono: la membrana corionallantoidea, la vescicola amniotica, i placentomi e il feto. Inoltre, vi sono una serie di cambiamenti nel tratto riproduttivo sensibili alla palpazione a supporto di una diagnosi positiva di gravidanza: l'incapacità di retrarre la cervice, la presenza di liquido all'interno dell'utero e la sua fluttuazione, l'aumento del diametro e l'asimmetria delle corna uterine, l'ipertrofia e il *fremitus* dell'arteria uterina media (Christiansen, 2021). Tuttavia, incorrono anche dei cambiamenti a livello ovarico: la presenza di un CL ipsilaterale ad un corno uterino ingrossato e ripieno di liquido suggerisce una gravidanza (Youngquist, 2007).

La diagnosi precoce di gravidanza viene effettuata a partire dal 30°giorno post fecondazione, basandosi sui seguenti rilievi: CL gravidico, percezione della fluttuazione, della vescicola amniotica e dello scivolamento delle membrane (Christiansen, 2021).

La vescicola amniotica è un sacco turgido e ripieno di liquido che circonda l'embrione nelle prime fasi della gestazione. Può essere palpata come un piccolo nodo di circa 6-7 mm di diametro entro 32-35 giorni di gestazione. A 6 settimane il diametro è di 1,5 cm e a 7 di 3,5-5 cm. A 8 settimane, la vescicola sarà di 6-7 cm e perderà il suo turgore, consentendo la palpazione del feto attorno al 60° giorno. (Christiansen, 2021)

A queste caratteristiche repertabili vanno associati segni clinici tra cui: il mancato ritorno in calore, a 30 giorni di gravidanza le labbra vulvari sono asciutte, pallide e con rughe trasversali, le perdite vulvari sono scarse (Bottarelli, 1989).

L'individuazione del CL gravidico ha valore per individuare il corno eventualmente gravido. All'esame anatomico il corpo luteo gravidico si presenta affondato nello stroma ovarico, poco sporgente sulla superficie ovarica, senza colletto ed ombelicatura e ricoperto da epitelio opaco simile a tessuto connettivo. Alla sezione il centro è occupato da una piccola striscia longitudinale di tessuto connettivo biancastro (Bottarelli, 1989).

Le probabilità di gravidanza in presenza del CL sono attorno al 70-75%, poiché il restante 25.30% delle bovine fecondate e non tornate in calore non sono gravide, ma presentano un CL persistente soprattutto se la FA è avvenuta prima dei 60 giorni dal parto (Bottarelli, 1989).

CAPITOLO 4: TEST BIOCHIMICI PER LA DIAGNOSI DI
GRAVIDANZA PRECOCE

Una diagnosi accurata e tempestiva di gravidanza o non-gravidanza è fondamentale per una gestione efficiente della mandria, soprattutto negli allevamenti di bovine da latte, dove la redditività si basa in gran parte sull'efficienza riproduttiva delle vacche.

Tradizionalmente si utilizzano i metodi di diagnosi diretta (palpazione rettale ed esame ecografico), i quali però richiedono la presenza di un veterinario esperto ed inoltre non sono in grado di diagnosticare la gravidanza o non-gravidanza prima dell'estro immediatamente successivo alla fecondazione con una buona accuratezza. Inoltre, in seguito alle manipolazioni dell'utero durante la visita ginecologica, aumenta il rischio di morte embrionale precoce. Dati questi presupposti, è in continuo aumento l'interesse verso test biochimici.

Attualmente sono disponibili diversi test per la diagnosi di gravidanza nella bovina. Questi test rilevano ormoni associati alla gravidanza o la presenza di specifiche molecole nel sangue materno e nel latte. Tuttavia, a differenza dei metodi di diagnosi diretta, questi test usati singolarmente non sono in grado di stadiare la gestazione (Dempsey, 2021).

Il test di diagnosi di gravidanza ideale nella bovina dovrebbe essere simile al test per la gravidanza nella donna, il quale ricerca la presenza di gonadotropina corionica umana (hCG) che riesce a diagnosticare la gravidanza con elevata accuratezza (>99%), già 8-10 giorni dopo il concepimento. Non sono presenti molecole analoghe prodotte nella specie bovina che possano essere testate.

Al contrario, sono stati sviluppati test per accertare la presenza di alcune molecole associate alla gravidanza, come l'elevata concentrazione di progesterone (P4), le glicoproteine associate alla gravidanza (PAGs), il fattore di gravidanza precoce (EPF) e i geni stimolati dall'interferone (ISG) (Lucy M, 2011).

4.1. IL DOSAGGIO DEL PROGESTERONE (P4)

I livelli di progesterone nel siero e nel latte aumentano costantemente dopo l'ovulazione, con lo sviluppo del CL funzionale. Nelle femmine non gravide il P4 diminuisce quando il CL regredisce e la vacca torna in estro, al contrario se è gravida, il CL permane e i livelli di P4 permangono elevati per sostenere la gravidanza (Dempsey, 2021). Studi sul ciclo estrale delle bovine indicano che le concentrazioni di P4 nel latte e nel siero raggiungono il valore massimo tra i 13-14 giorni dopo l'estro, se l'animale è gravido, continuano a rimanere elevate fino al 21° giorno post fecondazione e oltre. I livelli elevati tra il 18° e 24° giorno dopo l'inseminazione costituiscono la base per l'instaurarsi della gravidanza. Sebbene basse concentrazioni di P4 a 18-24 giorni possono predire

con precisione la mancata gravidanza, alte concentrazioni di P4 in questo intervallo di tempo non sono indicatori specifici di gravidanza a causa delle variazioni nella durata del ciclo estrale e l'incidenza di mortalità embrionale precoce (Balhara, 2013). Sono disponibili diversi ELISA test per dosare il P4 nel siero e nel latte. Questo test è risultato utile per diagnosticare le vacche *open*; infatti, sono state riportate percentuali di rilevamento del 95%-100% nell'individuazione della non gravidanza (Dempsey, 2021).

4.2. ALTRI TEST

Glicoproteine associate alla gravidanza (PAGs)

Le glicoproteine associate alla gravidanza (PAGs) sono prodotti secretori delle cellule trofoblastiche presenti nei placentomi bovini (Balhara, 2013). Queste glicoproteine sono peptidasi aspartiche, non proteoliticamente attive. La prima PAG scoperta è stata la proteina B specifica della gravidanza (PSPB). Essa è prodotta dalle cellule binucleate del trofoblasto nella placenta bovina, al momento dell'impianto. La PSPB si ritrova nel siero della madre a partire dal momento in cui avviene l'impianto e permane per tutta la durata della gestazione e spesso persiste anche nel post-partum. In commercio sono disponibili test RIA, ELISA affidabili a partire dal 24° giorno dopo inseminazione (Dempsey, 2021).

Fattore di gravidanza precoce (EPF)

L'EPF è un ormone immunosoppressivo rilevabile nel siero già 6-24 ore dopo la fecondazione. In caso di morte o rimozione embrionale, esso scompare in 24-48 ore. L'EPF è presente nel siero fino ai due-terzi della gestazione. L'EPF agisce come immunomodulatore proteggendo l'embrione dal rigetto materno. L'unico test affidabile per la ricerca dell'EPF è il test di inibizione della rosetta (RIT), che risulta positivo se i linfociti T si dispongono a rosetta. Risulta molto utile per identificare le vacche non gravide ma non viene quasi mai utilizzato in campo poiché richiede molto tempo per l'attuazione (Dempsey, 2021).

Geni stimolati dall'interferone (ISG)

Nella specie bovina, l'interferone tau (IFN- τ) è la molecola primariamente responsabile del riconoscimento materno della gravidanza. È secreto dalle cellule del trofodermis del *conceptus* e ha un'azione paracrina sulle cellule dell'endometrio inibendo la secrezione pulsatile di PGF $_{2\alpha}$,

inibendo la luteolisi. La concentrazione di IFN- τ non è misurabile perché esso è presente in concentrazioni bassissime nel sangue materno.

L'IFN- τ inoltre induce l'upregulation di molteplici ISG diversamente espressi nei leucociti materni. Tra questi ISG vi è la proteina 15-kDa trascritta dal gene ISG15. L'espressione dell'mRNA di ISG15 in globuli bianchi materni segue un andamento simile a quello del rilascio dell'INF- τ , esprimendosi per la prima volta attorno al 14° giorno dopo il concepimento, raggiungendo il picco tra il 17° e 18° giorno e diminuendo dal 21° al 26° giorno. L'ISG15 è dunque rilevabile nel siero all'inizio della gravidanza e potrebbe essere utile per diagnosticare la non gravidanza prima del successivo ritorno in estro (Dempsey, 2021).

CAPITOLO 5: ULTRASONOGRAFIA IN GINECOLOGIA BOVINA

5.1. TECNICHE ECOGRAFICHE E STRUMENTI

L'ultrasonografia è metodo di diagnostica per immagini che utilizza gli ultrasuoni: energia meccanica sotto forma di onde sonore con una frequenza superiore a quella mediamente udibile dall'orecchio umano, circa 20 KHz (Carovac, 2011). L'utilizzo di questa metodica si è ampiamente diffuso anche in ginecologia buiatrica.

Principi di fisica degli ultrasuoni

Il suono è un'onda caratterizzata da una frequenza (ν), un periodo (T), lunghezza d'onda (λ), velocità di propagazione, ampiezza e intensità. Frequenza, periodo, ampiezza e intensità dipendono dalla sorgente del suono; la velocità dipende dal "medium" attraversato; la lunghezza d'onda (λ) è determinata dalla sorgente e dal "medium". La velocità di propagazione dell'ultrasuono dipende dalla densità del mezzo e dalla sua "rigidità" (resistenza alla compressione) (Drost, 2013). Assumendo la densità costante, la velocità di propagazione aumenta all'aumentare della resistenza alla compressione. Assumendo costante la resistenza alla compressione, la velocità cala all'aumentare della densità. Tuttavia, poiché le differenze di resistenza alla compressione dei materiali è solitamente maggiore delle loro differenze di densità, gli ultrasuoni (US) sono più veloci in mezzi molto densi. La velocità degli ultrasuoni è bassa attraverso i gas, più elevata attraverso i liquidi, ancora maggiore attraverso i solidi. La velocità media nei tessuti (osso escluso) è di 1540 m/sec. In ecografia viene utilizzata un'onda pulsata (non continua), caratterizzata dunque da più frequenze. Quando gli US attraversano i vari tessuti, l'ampiezza e l'intensità diminuiscono con il procedere dell'US in profondità, subendo un fenomeno definito "attenuazione". L'attenuazione comprende l'assorbimento (conversione del suono in calore), riflessione e scattering (il suono viene ridistribuito in tutte le direzioni a causa di superfici irregolari o "medium" eterogeneo. Più la frequenza è bassa, più l'onda va in profondità. L'interfaccia tra un'onda e una struttura forma un "eco".

Il principio di formazione degli echi è importante perché gli echi contengono le informazioni diagnostiche delle strutture. Una parte dell'eco incidente viene trasmesso al tessuto sottostante e una parte viene riflessa, dipendentemente dall'impedenza acustica del tessuto (l'impedenza acustica di un tessuto è il prodotto della densità del tessuto per la velocità dell'onda). Solo gli echi riflessi sono usati per la formazione dell'immagine (Drost, 2013).

Le onde pulsate vengono trasmesse ai tessuti tramite l'utilizzo di una sonda. La sonda è un trasduttore che converte impulsi elettrici in ultrasuoni, e viceversa. La conversione viene effettuata dai cristalli piezoelettrici che vengono deformati, quando colpiti da carica elettrica, generando un'onda sonora. Le sonde sono presenti in diverse forme e dimensioni. La scelta dipende dalle proprietà fisiche del trasduttore e dalle caratteristiche anatomiche della regione da indagare (Drost, 2013).

Strumenti utilizzati in ginecologia buiatica

Le sonde sono classificate a seconda che forniscano una scansione lineare (sonda lineare), settoriale, o convessa (convex) della sezione di tessuto. Le sonde lineari sono quelle maggiormente utilizzate in ginecologia buiatica. Esse contengono un gran numero di cristalli piezoelettrici allineati lungo l'asse longitudinale della sonda distribuiti su di una lunghezza di 5-15 cm. La sonda lineare genera un'immagine rettangolare di lunghezza costante e sufficiente a coprire la regione in esame. Al contrario, con la sonda di tipo convex è possibile esaminare una zona più ampia poiché i cristalli sono posizionati su di una superficie convessa (Gayrard, 2010). Le sonde lineari sono lo strumento di elezione per l'esame trans-rettale poiché garantiscono un'alta risoluzione del campo più vicino, una maggiore superficie di contatto e perché la loro forma ne permette una manipolazione più sicura nel retto.

Le unità ecografiche possono essere distinte in modelli portatili e non portatili. Le unità non portatili sono strumenti di grande ingombro e peso e benché garantiscano una qualità di immagine elevata, non sono utilizzabili in condizioni di campo. Le unità portatili possono a loro volta essere suddivise in portatili (3-12 kg) ed ultraportatili (Figura 10). Le unità ultraportatili sono le più comunemente utilizzate in campo (Gnemmi G. , 2013).

Per l'esame ginecologico svolto in campo, la sonda lineare rettale con frequenza compresa tra i 4MHz e 9MHz è la più versatile e più usata.



Figura 10: Ecografo ultraportatile Draminski, con sonda lineare rettale (4-9 MHz). Immagine tratta dal sito ufficiale (draminski.com).

Esecuzione dell'esame ecografico transrettale

Inizialmente, l'animale dev'essere trattenuto in sicurezza per evitare eventuali lesioni all'operatore e agli strumenti. È necessario svuotare il retto dalle feci per avere un'eccellente qualità d'immagine, essenziali soprattutto in caso di diagnosi di gravidanza precoce o sessaggio fetale. La sonda lubrificata viene dunque inserita nel retto e si procede eseguendo un esame sistematico del tratto riproduttivo. Si individua l'ovaio e poi si scende dall'apice del corno, proseguendo attraverso il corno si arriva al corpo dell'utero, si risale verso il corno controlaterale e si giunge all'altro ovaio. La cervice e la vagina possono essere esaminate, mentre viene ritirata la sonda, al termine dell'esame. Gli errori più comuni nella scansione transrettale sono dati da interferenze di letame o gas, scansione incompleta del tratto riproduttivo e settaggio improprio dell'apparecchio (Gayraud, 2010)(Figura 11).

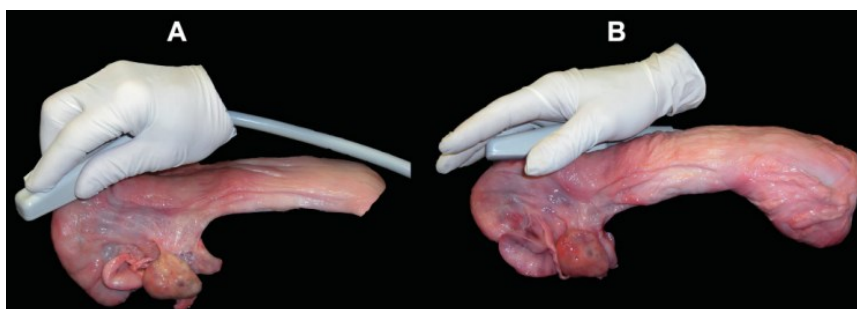


Figura 11: Sono rappresentati due metodi per impugnare la sonda per l'esame transrettale. Modalità controllata (a sinistra), modalità palmare (a destra). La sonda viene spostata lungo tutto il tratto genitale e ovaie. Immagine tratta da (DesCoteaux, 2021)

La formazione dell'immagine

Il fascio di ultrasuoni generato dalla sonda, incontra diverse interfacce e produce echi rilevabili. Questi echi sono processati per produrre l'immagine ecografica. Ogni elemento dell'immagine è chiamato pixel. L'immagine appare sullo schermo con una profondità determinata dalla latenza di ritorno dell'eco ed è formata dagli echi provenienti da diverse linee di scansione che compongono il piano della sezione. La luminosità delle diverse parti dell'immagine varia a seconda dell'intensità dell'eco: le strutture anecogene (liquido follicolare, liquido amniotico e allantoico, urina) appaiono nere, mentre le strutture altamente ecogene (osso, gas) appaiono bianche. Le strutture con ecogenicità intermedia sono rappresentate con tonalità di grigio (Gayrard, 2010).

5.2. CARATTERISTICHE ECOGRAFICHE DELLE STRUTTURE OVARICHE

L'ovaio può essere esaminato, ruotando la sonda lentamente per ottenere diverse immagini (trasversali o longitudinali). Le ovaie inattive sono ovali e presentano un'ecogenicità abbastanza uniforme. Le strutture dell'ovaio che sono facilmente osservabili ecograficamente sono: stroma ovarico, follicoli, corpi emorragici, CL con (con o senza cavità), i vasi sanguigni ovarici e vasi periferici (Gayrard, 2010).

5.2.1. I FOLLICOLI

Indipendentemente dalla fase del ciclo estrale o dal giorno post-partum, i follicoli si distinguono facilmente con l'ecografia. Appaiono come strutture anecogene, scure, a volte delineate da una sottile parete e di dimensioni solitamente < 25 mm. A causa della mancanza di attenuazione dell'onda ecografica, di solito si vede un bordo iperecogeno nella zona distale del follicolo (Figura 12). Tuttavia, l'ecografia mostra solo la cavità follicolare e di conseguenza il vero diametro del follicolo viene spesso sottostimato di 2-3 mm (Hanzen, 2000). La presenza di più follicoli o di CL può provocare una compressione dei follicoli facendoli apparire irregolari (Pierson, 1988). Durante il metaestro, l'avvenuta ovulazione può essere indirettamente verificata ecograficamente per la scomparsa del follicolo pre-ovulatorio o dalla sua rapida diminuzione di dimensioni. Inoltre, è possibile individuare il corpo emorragico con un trasduttore da 5MHz, il primo giorno dopo l'estro, anche se l'esame di routine si svolge tra i 3 e 5 giorni dopo l'ovulazione.

Il corpo emorragico in via di sviluppo è una struttura irregolare, poco delineata, di colore grigio-nero, con diversi punti ecogeni al suo interno (Hanzen, 2000).

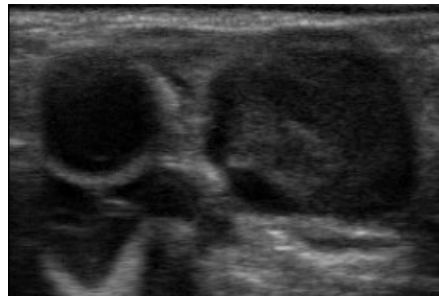


Figura 12: Rappresentazione ecografica di ovaio con un follicolo di grandi dimensioni e CL compatto, immagine presa con sonda lineare rettale a 5 MHz. (Immagine in gentile concessione della Dott.ssa Morelli)

5.2.2. IL CORPO LUTEO

In ginecologia bovina è molto importante riconoscere la presenza del corpo luteo, poiché esso indica che la manza ha raggiunto la pubertà. La localizzazione del CL sull'ovaio di destra o sinistra può indicare in quale corno uterino si instaurerà la gravidanza. Definire l'età del CL può essere utile anche per decidere quando e se iniziare un protocollo di ovulazione sincronizzata (OvSynch) o proporre un trattamento con prostaglandine per indurre la luteolisi (Carrière, 2010). A seconda dello stadio di sviluppo, il CL assume un aspetto differente.

Il CL nella fase diestrale può apparire incorporato nell'ovaio o protrudere dalla superficie ovarica. Il CL ha una struttura ecogena granulare che aumenta durante il diestro. Il CL maturo appare come un'area ipoecogena grigiastria (rispetto allo stroma ovarico) (Figura 12) e talvolta può essere visibile una linea di demarcazione tra il suo perimetro e lo stroma ovarico (Hanzen, 2000) (Carrière, 2010). Ecograficamente possiamo distinguere le differenze tra un CL maturo compatto e un CL cavitario (CCL). Le ovaie possono contenere più di un CL e questi possono essere compatti e/o con cavità. La dimensione della cavità varia considerabilmente e occasionalmente si può osservare una striscia ecogena (fibrina) all'interno della cavità (Carrière, 2010).

Durante i primi 10 giorni del ciclo ovarico, il 30-50% di tutti i CL, sviluppa una cavità. Il CCL è considerato una struttura fisiologica che produce normali livelli di progesterone. La cavità può essere centrale o eccentrica e più di una nello stesso CL e avere un diametro compreso tra 2 e 22 mm (Hanzen, 2000). Tra il 10° e 15° giorno del ciclo estrale, la maggior parte dei CCL perde la

propria cavità. La cavità viene sostituita da nuovo tessuto ecogeno, che può apparire in differenti forme (Figura 12):

- tessuto iperecogeno rispetto al restante tessuto luteinico;
- riempimento graduale parziale o completo;
- cavità completamente sostituita da tessuto luteinico con banda iperecogena al centro;
- la cavità permane ma vi è un anello iperecogeno che la circonda (Carrière, 2010).

Il CL in regressione è più difficile da individuare poiché la linea di demarcazione tra il CL e lo stroma ovarico è debole, a causa della lieve differenza di ecogenicità tra i tessuti (Hanzen, 2000).

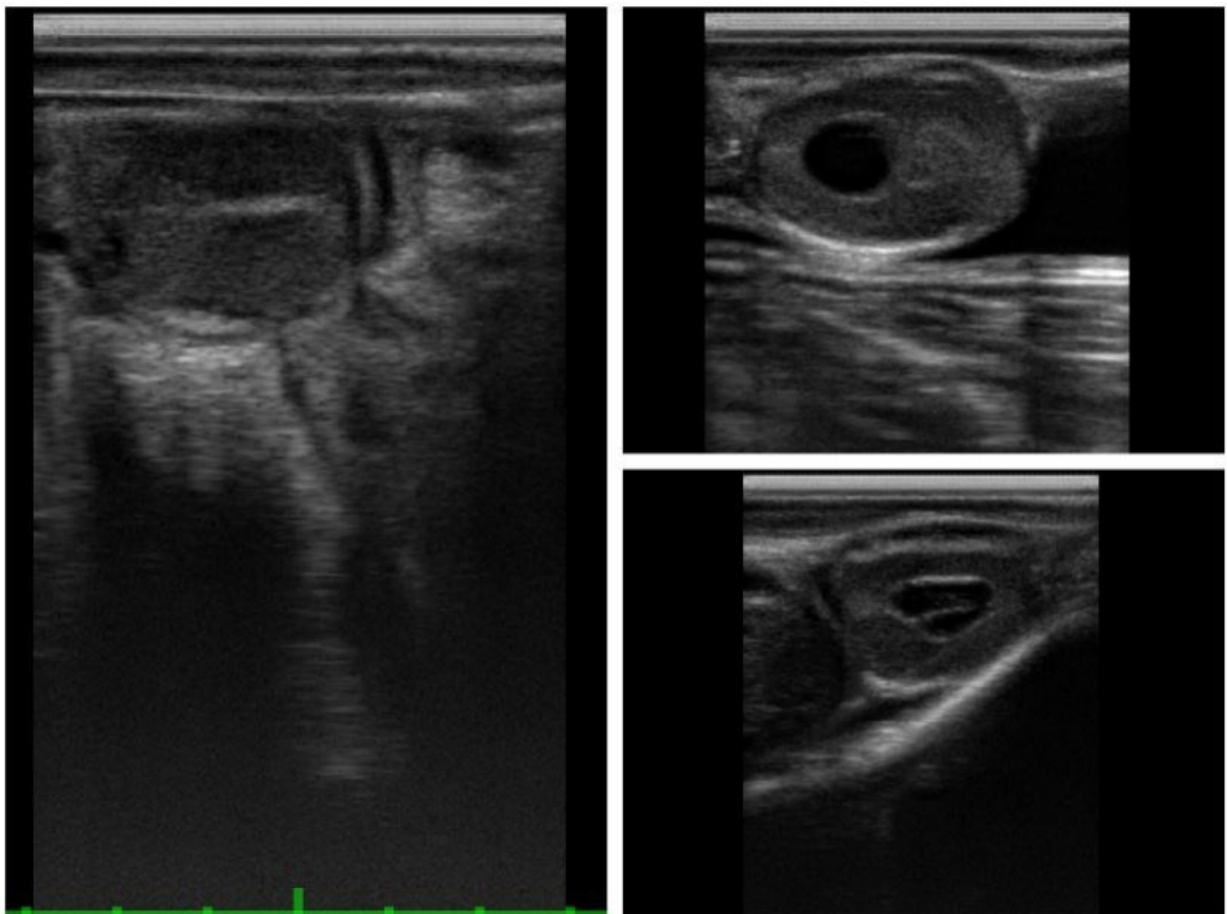


Figura 12: A sinistra, un CL in cui la cavità è stata riempita ed è evidente una banda iperecogena in posizione centrale. A destra, in alto, un CL cavitario con cavità anecogena circondata da lieve anello iperecogeno. A destra, in basso, CL cavitario con trabecole di fibrina all'interno della cavità (sonda lineare rettale, 5 MHz) (immagini in gentile concessione della Dott.ssa Morelli).

5.3. DIAGNOSI DI GRAVIDANZA PRECOCE MEDIANTE VISITA ECOGRAFICA

È teoricamente possibile identificare il *conceptus* mediante visita ecografica a 21 giorni post FA, ma questo solitamente non viene svolto in condizioni di campo.

Una diagnosi certa di gravidanza si basa sulla presenza di uno o più CL su una o entrambe le ovaie, sulla presenza di liquido nell'utero, ma soprattutto sulla presenza di uno o più embrioni. La sola presenza di CL e di liquido uterino permette soltanto di formulare una diagnosi di sospetto di gravidanza (Gnemmi G. , 2013).

Prima dei 21 giorni di gestazione l'utero e le ovaie appaiono come nella fase diestratale. Un lieve aumento di fluido può essere visibile nel lume uterino al giorno 21-23 della gestazione. L'evidenziazione dell'embrione è possibile anche molto precocemente (22°giorno) ma in condizioni di campo, è difficile individuarlo fino al 24° giorno. L'utero gravido ha l'endometrio meno spesso rispetto all'estro (Colloton, 2021).

A 28 giorni, la diagnosi di gravidanza è più facile, veloce ed accurata. I criteri di valutazione della qualità della gravidanza sono diversi: frequenza cardiaca, intorbidimento del liquido amniotico e allantoideo, separazione della membrana corion allantoidea, edema dell'endometrio, presenza o dell'embrione e dimensioni dell'embrione. La migrazione del tubercolo genitale inizia ai 45 giorni e termina tra i 52-55 giorni, per cui il sessaggio fetale viene svolto agevolmente a 60 giorni (Gnemmi G. , 2013).

CAPITOLO 6: CONTRIBUTO SPERIMENTALE

6.1. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è volto a descrivere le caratteristiche percepibili all'esame clinico ginecologico e alla valutazione ecografica del tratto genitale e del corpo luteo in bovine a 21 giorni post FA. Confrontare le caratteristiche rilevate tra le vacche diagnosticate gravide e non gravide, identificare la presenza di pattern all'interno di ogni gruppo e confrontarlo tra i gruppi.

Analizzare mediante software e descrivere la frequenza dei parametri che definiscono dimensioni ed ecogenicità dei CL gravidici a 21 e 31 giorni post FA e dei CL ciclici a 21 giorni post FA. Confrontare i parametri tra il gruppo delle bovine gravide e non gravide e identificare eventuali differenze e correlazioni.

6.2. MATERIALI E METODI

Sito e Animali

Lo studio è stato condotto nel periodo da maggio 2022 a marzo 2023 presso l'Azienda Montelupo di Maggiali, Venturelli, Ferrari, sita in Neviano degli Arduini (Parma, Emilia-Romagna) (Figura 13), a circa 450 s.l.m.

Gli animali inseriti nello studio sono stati sottoposti a visita clinico-ginecologica ed indagine ultrasonografica dell'apparato genitale a partire dal 12 maggio 2022, iniziando l'arruolamento dei soggetti dalla prima diagnosi di fase estrale, che per praticità coincideva con la prima



Figura 13: Azienda Montelupo sede dello studio

fecondazione artificiale (FA) di ciascun soggetto arruolato nello studio. Successivamente, l'arruolamento dei soggetti e le visite di controllo con diagnosi di gravidanza, così come la raccolta dei dati come riportato in seguito ogni 21 giorni. L'Azienda Montelupo è costituita da un totale

di 300 capi di cui 170 vacche in lattazione, di razza Holstein Friesian, suddivise per gruppo di asciutta e lattazione e da circa. Il latte prodotto viene conferito per la produzione di Parmigiano Reggiano (Figura 1).

La stalla è di tipologia a stabulazione libera. La mungitura viene svolta 2 volte al giorno (4.00h-16.00h). La razione quotidiana per le bovine in lattazione prevede un rapporto concentrati-fieno di 40:60. Il fieno è costituito per il 50% da erba medica e per il 50% da graminacee. Per quanto riguarda i mangimi concentrati, sono presenti in stalla autoalimentatori (DeLaval®) a due linee (linea 1 con cereal-mais, linea 2 con mangime proteico)

Per l'indagine sono state arruolate 60 bovine in lattazione delle quali: 22 al 1° post-partum, 9 secondipare e 29 pluripare.

Protocollo

Fase 1

In prima giornata di visita, tramite impiego di tracciato podometrico e rilevamento visivo è stata rilevata la presenza di manifestazioni estrali; gli stessi soggetti sono stati sottoposti a visita clinico ginecologica, manuale ed ecografica. La visita clinico ginecologica prendeva in considerazione i seguenti parametri:

- edema vulvare;
- fuoriuscita del tipico muco da calore con caratteristiche fisiologiche (limpido e filante);
- palpazione dell'utero per valutarne la tonicità;
- palpazione della cervice per valutarne mobilità e pervietà;
- ovaio con presenza di follicolo maturo.

In caso di conferma dell'estro, le bovine sono state fecondate la stessa mattina, ed eventualmente la mattina successiva, comunque entro le 48 ore dal primo rilevamento dall'estro accertato. Le inseminazioni sono state effettuate con pistolette mediante utilizzo di seme congelato prevalentemente sessato, messo in commercio dalla BSA®.

Fase 2

Diagnosi precoce di gravidanza: 21 giorni dopo l'FA, attraverso una valutazione clinico-ginecologica ed ecografica era effettuata la diagnosi di gravidanza. Nella medesima giornata, altre bovine in estro erano arruolate nello studio e quindi fecondate.

Per l'esame ultrasonografico è stato utilizzato un apparecchio ultrasonografico con sonda lineare (DRAMINSKI® iScan 2, Gietrzwałd Poland, sonda lineare rettale, 5MHz – 9MHz), in modalità B-mode.

Le visite clinico-ginecologiche ultrasonografiche sono state effettuate dal medesimo operatore (medico veterinario esperto) che le ha valutate secondo alcuni parametri:

- Stato mentale: calma/agitata;
- Segnalamento di eventuali nozioni rilevanti sullo stato anamnestico clinico e ginecologico dell'animale.
- Esame esterno della vulva: Edema (+/-), Arrossamento (+/-), Umidità (+/-);

Tramite esplorazione rettale, si eseguiva la palpazione delle principali strutture, associando l'esame ecografico e la valutazione dei seguenti parametri:

- Utero: flaccido (+/-), tonico (+/-), succulento (+/-);
- Cervice: edema (+/-), dilatazione (+/-);
- Ovaio e palpazione del CL: Forma (rotonda/ovoidale), Turgidità (-/+), Lateralità (sinistra – sx/destra-dx);
- Il CL è stato valutato dall'operatore che ha assegnato un punteggio di "ECO +", "ECO ++", "ECO +++" a seconda del grado di ecogenicità;
- Segnalamento di eventuali caratteristiche particolari rilevate alla palpazione del CL.

È stata registrata l'immagine ecografica della sezione ovarica contenente il CL a 21 giorni, utilizzando la modalità FREEZE (*screenshot*) dell'ecografo e salvandola sul dispositivo.

Successivamente, le bovine visitate a 21 giorni post FA, sono state rivalutate per la diagnosi di conferma di gravidanza a 31 giorni post FA. Le immagini ecografiche del CL gravidico delle bovine risultate positive alla diagnosi di conferma a 31 giorni sono state salvate su dispositivo.

Infine, le bovine sono state considerate gravide, solo se la gravidanza era riconfermata ai 60 giorni post FA, tramite visita clinico ginecologica ed esame ultrasonografico. La visione ecografica del battito fetale e l'integrità della membrana corion-allantoidea sono state la conferma finale.

Tutti i dati raccolti sono stati riportati in una scheda individuale (Figura 14).

Azienda: MONTELUPO

Data:

N° aziendale:				Data FA:				
Eco a 21		Eco a 31		Note:		Caratteristiche CL:	Ecogenicità:	
								Gravida:
Palpazione CL	Utero		Vulva			Stato Mentale	Cervice	Stato Anamnestico Soggettivo
Forma:	Flaccido:	Edema:	Calma			Edema:		
Turgidità:	Tonico:	Arrossamento:	Agitata	Dilatazione:				
Lateralità:	Succulento:	Umidità:						

Figura 14: Scheda individuale fac-simile utilizzata in campo per la raccolta dati durante la visita clinico ginecologica a 21 giorni post FA.

Fase 3

Le immagini ecografiche raccolte sono state trasferite su PC (Lenovo[®], V15-IIL, China) e analizzate mediante il software di analisi di immagini (ImageJ[®] 1.53t, National Institutes of Health, USA, Java 1.8.0_345, 64-bit) e i dati ottenuti registrati per ulteriori elaborazioni. Sono state analizzate un totale di **64 immagini ecografiche** suddivise in 4 gruppi:

- **Gruppo A:** CL gravidico a 21 post FA (n=21) in presenza del conceptus,
- **Gruppo B:** CL gravidico a 31 giorni post FA (n=14) in presenza dell'embrione,
- **Gruppo C:** CL ciclici a 21 giorni post FA (n=21) di vacche con diagnosi negativa,
- **Gruppo D:** CL gravidico a 21 e 31 post FA (n=8) di bovine diagnosticate non gravide (diagnosi di gravidanza negativa) all'esame di riconferma a 60 giorni.

Inoltre, le immagini del gruppo A sono state suddivise ulteriormente in **A1** (n=14, CL gravidici a 21 giorni post FA di vacche con corrispettivo nel gruppo B) e **A2** (n=7, CL gravidici a 21 giorni post FA);

Ogni immagine è stata analizzata mediante il software ImageJ per definire le dimensioni e l'ecogenicità. L'utilizzo del software prevede inizialmente il settaggio dell'unità di misura:

mediante la funzione “Set Scale” è stata settata la scala in funzione della profondità d’immagine “Depth”:

- “Depth” 10 cm: 50 pixel/cm;
- “Depth” 8 cm: 62,5 pixel/cm;
- “Depth” 12 cm: 40 pixel/cm.

Tutte le misurazioni sono state svolte da un unico operatore. È stata impostata una regione di interesse (ROI), corrispondente all’area del CL, presa mediante lo strumento di selezione ellittica presente nella barra strumenti (“Oval → Elliptical selection”). Le regioni non rappresentative del tessuto luteinico sono state escluse dalla ROI (artefatti, tessuto connettivo stromale, cavità ripiena di liquido). Il software ha calcolato l’intensità luminosa di ogni pixel che compone la ROI.

È stata analizzata l’intensità di ogni pixel, definita come valore, in una scala di grigi, compreso tra 0 e 255 (scala 0-255, 0=nero e 255=bianco) (Figura 15).

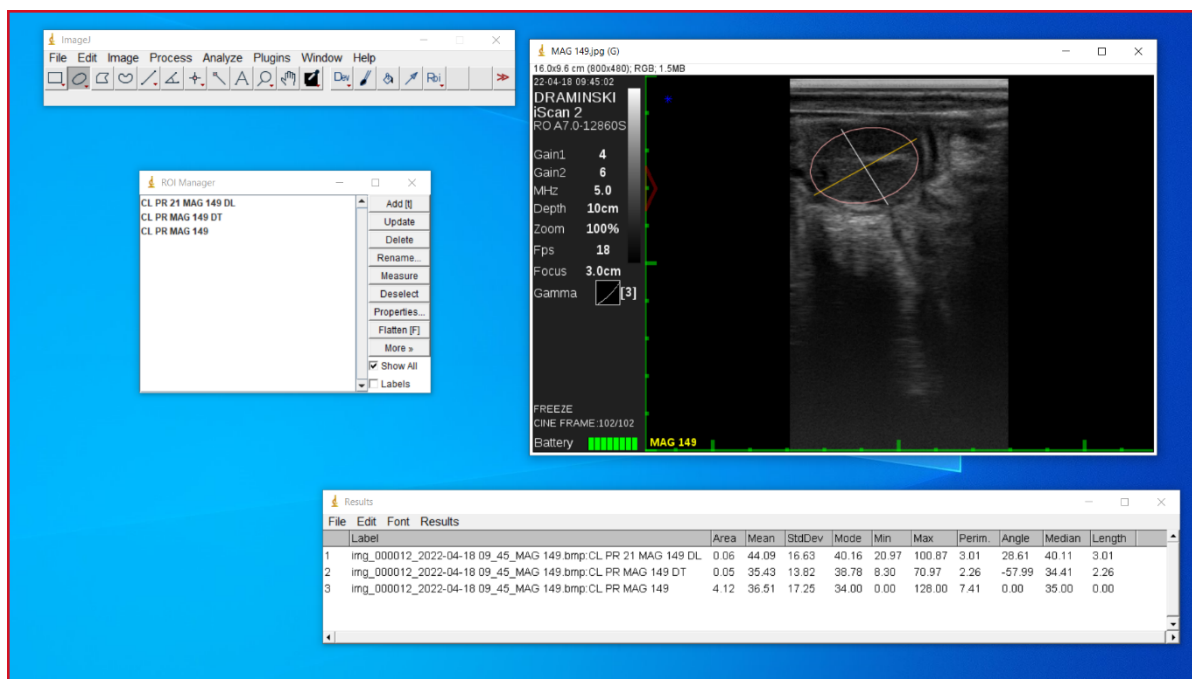


Figura 15: Schermata di lavoro del software ImageJ. In alto a sinistra, la barra degli strumenti, al di sotto il ROI Manager. A destra, l’immagine analizzata ed in basso i risultati ottenuti.

Sono stati calcolati i seguenti parametri per la valutazione delle dimensioni del CL in cm:

- Diametro longitudinale (DL) e trasversale (DT) del CL, indicati in immagine con i colori arancione e bianco, rispettivamente;
- Area del CL;

- Perimetro del CL, in rosa.

per la valutazione quantitativa dell'ecogenicità (ecostruttura) del CL:

- Mean pixel Value (0-255): valore medio di intensità dei pixel nella ROI;
- Eterogeneità: Deviazione standard del "Mean pixel Value";
- Moda (0-255): intensità luminosa che più si ripete all'interno della ROI esaminata.

Nel caso di CL cavitari, sono stati calcolati: diametro longitudinale, trasversale (in verde) e area della cavità (in blu). L'area della cavità è stata sottratta dall'area del CL, ottenendo un'analisi quantitativa esclusivamente su tessuto luteinico (Figura 16).

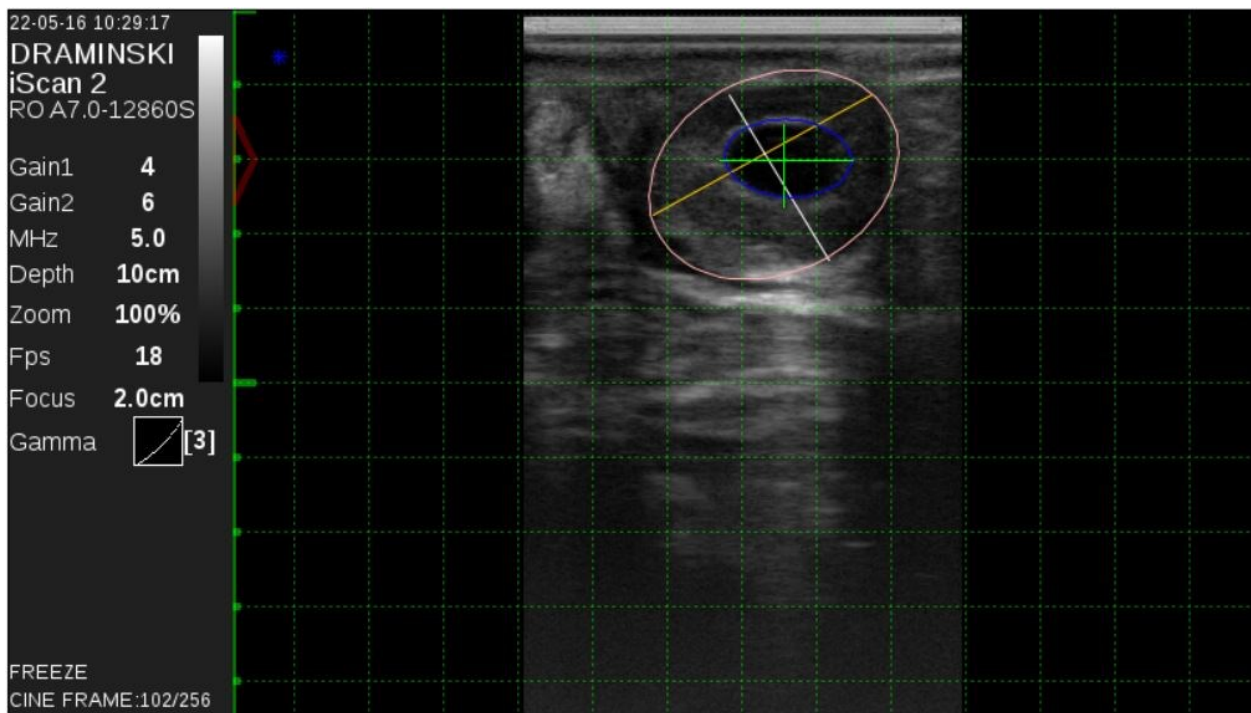


Figura 16: Tracciati di regioni d'interesse (ROIs) in CL cavitario.

Analisi statistica

I valori acquisiti dal software sono stati trasferiti su file Excel per tabulazione ed elaborati con il software "SPSS" (Statistical Package for Social Science[®] 2.8, SPSS Inc., Chicago, IL) per analisi statistica.

Le frequenze assolute (ECO +, ECO ++, ECO +++) ricavate mediante valutazione diretta da parte dell'operatore dalle immagini del CL presenti sul monitor dell'apparecchio ecografico, sono state analizzate mediante Test del Chi Quadro.

I dati raccolti relativi a dimensioni ed ecogenicità del CL in base allo stato ginecologico (gravida o non gravida), sono stati analizzati mediante procedura Multivariata del Modello lineare Generale, utilizzando lo stato ginecologico come effetto fisso. Il test post.hoc adottato è stato il Bonferroni.

Valori di p inferiori al limite di significatività α , stabilito al 5%, rigettano l'ipotesi nulla H_0 (non vi sono differenze tra i gruppi) e identificano una differenza statisticamente significativa tra i CL ciclici e gravidici e i CL a 21 e 31 giorni.

6.3. RISULTATI

Delle 60 vacche fecondate, 29 capi (48.33%) è risultato gravido (con riconferma a 60 giorni), 31 capi sono risultati non gravidici (51,67%). Il tasso di fertilità (bovine gravide su bovine inseminate) è risultato del 48,33%, come riportato nella seguente tabella (Tabella 1).

Fertility Rate	
N°gravide	29
N°inseminate	60
FR	0,48
FR(%)	48,33

Tabella 1: Tabella rappresentativa del parametro fertility rate.

Le gravidanze si sono distribuite tra le categorie come evidenziato nel seguente grafico (Figura 17). Sono risultate gravide 12 bovine al 1° post parto su 22, 4 secondipare su 9, 13 pluripare su 29.

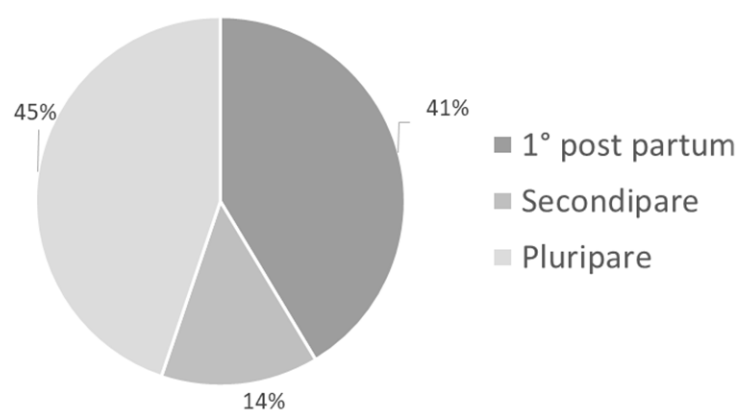


Figura 17: Grafico a torta, raffigurante le percentuali divise per categorie di bovine gravide.

Valutazione clinico ginecologica ed ecografica sul totale (n=24)

In tabella (Tabella 6.2) sono stati riportati tutti i dati raccolti in campo dalla visita clinico ginecologica, seguita da esame ecografico a 21 giorni post FA. Sono stati raccolti i dati di 24 bovine. Di queste, 13 bovine (54.16%) sono risultate gravide.

N° Aziendale	Eco 21	Ecogenicità	Eco 31	Palpazione CL			Utero		
				Forma	Turgidità	Lateralità	Flaccido	Tonico	Succulento
49	x	+		Rotonda	-	DX	+	-	+
59	x	+	x	Ovoidale	+	DX	-	+	-
1	x	+	x	Rotonda	+	SX	-	+	-
48	x	+		Rotonda	+	DX	-	+	-
124	x	+		Rotonda	+	DX	-	+	-
50	x	+		Ovoidale	+	DX	-	+	-
96	x	+		Rotonda	+	SX	-	+	-
12	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
32	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
78	x	++		Ovoidale	+	DX	-	+	-
101	x	++		Ovoidale	+	SX	-	+	-
130	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
164	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
161	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
93	x	++		Rotonda	+	SX	-	+	-
112	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
99	x	++		Rotonda	+	DX	-	+	-
178	x	++		Ovoidale	-	DX	-	+	-
33	x	++		Ovoidale	+	DX	-	+	-
20	x	++		Rotonda	+	SX	-	+	-
69	x	++	x	Rotonda	+	SX	-	+	-
107	x	+++	x	Rotonda	+	DX	-	+	-
145	x	+++		Rotonda	+	DX	-	+	-
147	x	+++		Rotonda	+	DX	-	+	-

Esame esterno e caratteristiche del tratto genitale

Sul totale di 24 bovine, 22 animali (92%) erano calmi e 2 (8%) agitati. In 23 bovine (96%), l'utero alla palpazione appariva tonico e in 1 caso (4%) flaccido. La cervice era edematosa 4 animali (17%) dei casi e pervia in 5 animali (21%). All'esame esterno, 8 animali (33%) avevano la vulva edematosa, 8 (33%) arrossata e 15 bovine (63%) umida. I dati con le frequenze relative ed assolute sono stati riportati in tabella (Tabella 2):

	Esame esterno ed esplorazione del tratto genitale (n = 24)									
	Utero			Vulva			Stato Mentale		Cervice	
	Flaccido	Tonico	Succulento	Edema	Arrossamento	Umidità	Calma	Agitata	Edema	Dilatazione
FA	1	23	0	8	8	15	22	2	4	5
FR	0,04	0,96	0,00	0,33	0,33	0,63	0,92	0,08	0,17	0,21
%	4%	96%	0%	33%	33%	63%	92%	8%	17%	21%

Tabella 2: Frequenze assolute, relative e percentuali dei parametri considerati nella visita clinico ginecologica a 21 giorni post FA.

Caratteristiche del CL alla palpazione e alla valutazione ecografica

Sul totale di 24 bovine, 18 CL (75 %) avevano forma rotondeggiante, 22 CL (92%) risultavano turgidi alla palpazione e 18 CL (75%) erano posizionati sull'ovaio di destra. dati relativi alla palpazione del CL sono riportati nella seguente tabella (Tabella 3)

	Palpazione Corpo Luteo CL (n = 24)					
	Forma		Turgidità		Lateralità	
	Rotonda	Ovoidale	Presenza (+)	Assenza (-)	Destra (DX)	Sinistra (SX)
FA	18	6	22	2	18	6
FR	0,75	0,25	0,92	0,08	0,75	0,25
%	75%	25%	92%	8%	75%	25%

Tabella 3: Frequenze relative, assolute e percentuali relative alla palpazione del CL a 21 giorni post FA.

Di 24 CL esaminati, l'operatore ha assegnato un punteggio di "ECO +" a 7CL (29,17%), "ECO ++" a 14CL (58,33%), "ECO +++" a 3CL (12,50%), come riportato in tabella (Tabella 4):

	Valutazione dell'Ecogenicità in campo (n = 24)	
	FA	%
ECO +	7	29,17%
ECO ++	14	58,33%
ECO +++	3	12,50%

Tabella 4: frequenze assolute e percentuali dei punteggi ecografici assegnati in campo dall'operatore

Valutazione clinico ginecologica ed ecografica di animali gravidi (n=13)

Nella seguente tabella (Tabella 5) sono stati riportati i dati relativi agli animali gravidi:

N° Aziendale	Ecogenicità	Palpazione CL			Utero				Vulva		Stato Mentale		Cervice	
		Forma	Turgidità	Lateralità	Flaccido	Tonico	Succulento	Edema	Arrossamento	Umidità	Calma	Agitata	Edema	Dilatazione
12	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
32	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
78	++	Ovoidale	+	DX	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
107	+++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
145	+++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
164	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
161	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
124	+	Rotonda	+	DX	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
112	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
96	+	Rotonda	+	SX	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
147	+++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
20	++	Rotonda	+	SX	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
69	++	Rotonda	+	SX	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-

Tabella 5: Tabella riassuntiva dei dati raccolti in campo relativa ad animali gravidi.

Esame esterno e caratteristiche del tratto genitale

Di 13 animali gravidi, 12 su 13 erano calmi, 13 (100%) presentavano un utero tonico, 10 (76,9%) avevano la cervice non edematosa e chiusa, mentre in 2 casi (15,38%) appariva edematosa e dilatata ed in 1 caso (7,69%) edematosa ma non dilatata.

Caratteristiche del CL alla palpazione e alla valutazione ecografica

Il CL si presentava turgido nel 100% dei casi (13 su 13 animali), in 12 animali su 13 aveva forma rotondeggiante e in 10 casi su 13 (77%) era localizzato sull'ovaio di destra. Su 13 bovine gravide, a 2 è stato assegnato un punteggio di ecogenicità di "ECO +", a 8 di "ECO ++" e a 3 "ECO +++".

La relativa frequenza percentuale dei dati precedenti è riportata nelle seguenti tabelle (Tabelle 6 e 7):

Gravide X Ecogenicità (n=13)			
	FA	FR	%
ECO +	2	0,15	15,38%
ECO ++	8	0,62	61,54%
ECO +++	3	0,23	23,08%

Tabella 6: Frequenze relative, assolute e percentuali dei punteggi di ecogenicità assegnati all'interno della categoria di vacche gravide.

Lateralità Corpo Luteo Gravidico (n=13)		
	FR	%
Destra (DX)	10	77%
Sinistra (SX)	3	23%

Tabella 7: Frequenza assoluta e percentuale sulla lateralità del CL in animali gravidi.

Analisi delle bovine non gravide (n=11)

Tutti i dati raccolti relativi alle bovine non gravide sono stati riportati nella seguente tabella (Tabella 8):

N° Aziendale	Ecogenicità	Palpazione CL			Utero				Vulva		Stato Mentale		Cervice	
		Forma	Turgidità	Lateralità	Flaccido	Tonico	Succulento	Edema	Arrossamento	Umidità	Calma	Agitata	Edema	Dilatazione
49	+	Rotonda	-	DX	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
59	+	Ovoidale	+	DX	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
1	+	Rotonda	+	SX	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
101	++	Ovoidale	+	SX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
130	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
48	+	Rotonda	+	DX	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
93	++	Rotonda	+	SX	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
50	+	Ovoidale	+	DX	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
99	++	Rotonda	+	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
178	++	Ovoidale	-	DX	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
33	++	Ovoidale	+	DX	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+

Tabella 8: Tabella riassuntiva dei dati raccolti in campo relativa ad animali non gravidi.

Esame esterno e caratteristiche del tratto genitale

Sul totale di 11 bovine non gravide, 10 erano calme. La vulva è apparsa non edematosa, non arrossata e non umida in 4 animali su 11 (36,36%), 2 (18,18%) al contrario avevano edema, arrossamento e umidità vulvare, 2 su 11 (18,18%) presentavano arrossamento e umidità ma non edema, 1 (10%) presentava edema ma non arrossamento e umidità. L'utero era tonico in 10 casi su 11. In 1 caso è risultato flaccido. La cervice in 8 casi (72,72%) non era edematosa né dilatata. In 1 caso (9%) era edematosa e dilatata e in 2 casi (18,18%) dilatata ma non edematosa.

Caratteristiche del CL alla palpazione e alla valutazione ecografica

Alla palpazione sono risultati turgidi 8 CL su 11, 6 avevano forma rotondeggiante e 5 ovoidale, 8 CL (73%) su 11 erano localizzati a destra. Alla valutazione ecografica a 5 è stato assegnato un punteggio di "ECO +", a 6 "ECO ++" e nessun CL appartenente ai non gravidi è stato valutato "ECO +++".

Le frequenze relative, assolute e percentuali dei punteggi di ecogenicità e di lateralità sono state riportate nelle seguenti tabelle (Tabelle 9 e 10):

Non Gravide X Ecogenicità (n = 11)			
	FA	FR	%
ECO +	5	0,45	45,45%
ECO ++	6	0,55	54,55%
ECO +++	0	0,00	0,00%

Tabella 9: Frequenze relative, assolute e percentuali dei punteggi di ecogenicità assegnati all'interno della categoria di vacche non gravide.

Lateralità Corpo Luteo Non Gravidico (n = 11)		
	FA	%
Destra (DX)	8	73%
Sinistra (SX)	3	27%

Tabella 10: Frequenza assoluta e percentuale sulla lateralità del CL in animali gravidi.

Confronto tra i gruppi di bovine gravide e non gravide

È stato eseguito il Test del Chi Quadro, per valutare la significatività statistica nel confronto tra il gruppo delle bovine gravide e quello delle bovine non gravide in termini del parametro ecogenicità (ECO+, ECO++, ECO+++) (Tabella 11).

	ECO +	ECO++	ECO+++	Totale
Gravide	2	8	3	13
Non Gravide	5	6	0	11
Totale	7	14	3	24

Tabella 11: Frequenze assolute relative ai punteggi ecografici per gruppo di gravide e non gravide.

Non è risultata una differenza statisticamente significativa ($\chi^2=2,930$), (p value = 0,231).

Tuttavia, nel confronto (Tabella 12):

	ECO +	Non ECO +	Totale
Gravide	2	11	13
Non Gravide	5	6	11
Totale	7	17	24

Tabella 12: Tabella 2 x 2 utilizzata per Test del Chi Quadro, tra i gruppi di gravide e non gravide ed ECO + e non ECO + (ECO++/ECO+++).

La differenza tra gli ECO+ e i NON ECO+ (ECO ++, ECO+++) è risultata una tendenza ad essere statisticamente significativa ($\chi^2=2,601$), (p value = 0,106), come dimostrato anche dalla frequenza assoluta (5 bovine su 7, con ECO+ erano non gravide).

Analisi dei parametri dimensioni ed ecogenicità mediante software

Nella seguente tabella sono stati riportati tutti i dati elaborati dal software ImageJ, (Tabella 13):

Identificazione		Misure CL				Valutazione Ecografica Computerizzata				
N° Vacca	Gruppo	DL	DT	Area	Perimetro	Media	Eterogeneità	Min. Pix	Max. Pix	Moda
69	A1	2,51	2,26	4,16	7,23	40,53	13,33	1	99	35
77	A1	2,31	1,87	3,41	6,58	37,98	18,92	2	130	27
100	A1	3,39	1,98	4,59	8,09	35,21	18,58	0	133	27
103	A1	3,37	2,37	5,59	8,73	51,26	20,22	0	128	57
109	A1	2,94	2,15	4,21	7,51	38,72	14,46	2	95	33
131	A1	2,62	2,48	4,38	7,42	32,71	15,07	0	103	25
133	A1	2,91	2,29	4,49	7,63	31,02	12,47	1	106	29
147	A1	2,51	2,33	4,28	7,35	37,8	18,13	1	177	30
149	A1	3,01	2,26	4,12	7,41	36,51	17,25	0	128	34
153	A1	3,14	2,46	2,49	8,53	43,75	24,63	0	161	22
141	A1	2,65	2,22	4,5	7,54	48,55	17,99	3	137	53
25	A1	3,22	2,05	4,66	8,04	32,75	14,07	1	92	28
71	A1	3,7	1,91	3,82	8,85	44,38	17,78	0	127	36
96	A1	3,11	2,32	3,73	8,42	38,93	17,95	1	138	25
7	A2	2,9	1,91	4,18	7,5	25,7	15,09	0	99	20
12	A2	2,66	2,29	4,9	7,93	37,26	15,46	0	101	27
20	A2	2,67	1,95	3,86	7,13	40,68	13,69	1	110	40
56	A2	3,28	1,83	4,74	8,21	39,17	14,95	3	99	34
156	A2	2,94	2,32	4,8	7,96	46,11	17,53	0	147	43
179	A2	2,89	2,24	5,09	8,2	36,43	13,64	2	119	33
94	A2	2,93	2,03	4,53	7,82	39,59	17,28	2	142	34

Tabella 13: Gruppo A (CL gravidici a 21 giorni)

Identificazione		Misure CL				Valutazione Ecografica Computerizzata (0 - 255)				
N° Vacca	Gruppo	DL (cm)	DT (cm)	Area (cm ²)	Perimetro (cm)	Media	Eterogeneità	Min. Pix	Max. Pix	Moda
69	B	2,7	1,94	3,98	7,19	49,3	16,89	1	123	47
77	B	2,45	2,4	4,57	7,59	42,22	20,46	0	167	34
100	B	2,26	1,46	2,38	5,62	32,92	13	2	95	32
103	B	3,4	2,37	5,33	8,48	49,11	17,88	3	125	48
109	B	2,5	2,09	3,91	7,02	45,27	21,29	0	160	37
131	B	2,72	2,53	4,22	7,29	42,52	13,43	0	98	40
133	B	3,38	2,51	5,38	8,5	50,99	19,03	0	131	49
147	B	2,72	2,86	4,75	7,73	26,61	12,66	1	122	18
149	B	3,52	2,13	4,77	8,27	39,41	18,54	0	131	30
153	B	3,2	2,48	5,36	9,27	41,99	23,05	1	197	24
141	B	3,84	2,14	5,66	9,16	36,93	16,38	2	126	30
25	B	2,87	2,32	5,71	8,62	33,47	16,23	0	135	23
71	B	2,98	2	4,68	8,02	40,39	18,61	1	115	33
96	B	2,86	2,69	5,77	8,8	42,8	21,46	0	194	36

Tabella 13: Gruppo B (CL gravidici a 31 giorni)

Identificazione		Misure CL				Valutazione Ecografica Computerizzata (0 - 255)				
N° Vacca	Gruppo	DL (cm)	DT (cm)	Area (cm ²)	Perimetro (cm)	Media	Eterogeneità	Min. Pix	Max. Pix	Moda
28	C	2,52	1,62	3,54	6,86	26,56	10,1	1	87	25
47	C	3,58	2,23	5,02	9,22	42,24	14,84	0	109	37
59	C	2,51	2,02	3,51	6,95	32,13	12,18	1	103	27
89	C	3,38	2,8	5,27	9,49	38,5	20,45	0	138	23
93	C	2,35	1,94	2,87	6,19	43,64	16,57	2	135	44
95	C	3,18	1,64	3,5	7,33	37,96	14,18	2	105	34
126	C	2,89	2,14	3,99	7,29	24,41	10,84	0	80	21
137	C	3,56	2,57	4,57	8,77	37,57	21,33	2	140	25
173	C	2,61	1,44	2,69	6,33	38,17	13,15	4	118	35
176	C	2,6	2,43	3,9	7,09	35,01	22,18	1	238	25
178	C	3,24	2,03	4,73	8,18	38,69	17,11	0	121	32
1050	C	2,9	1,76	3,13	6,63	31,93	15,39	0	109	27
105	C	2,86	2,4	4,82	8,47	39,44	19,83	0	128	37
1410	C	2,96	2,04	4,17	7,42	28,73	13,72	0	78	19
1800	C	4,42	2,54	8,52	11,07	51,53	18,22	4	159	42
180	C	2,72	2,27	2,16	6,88	35,85	19,83	0	111	28
25	C	2,8	1,61	3,51	7,09	31,72	19,3	0	152	22
330	C	3,03	2,25	5	8,14	38,03	18,56	1	111	22
33	C	3,15	1,81	4,86	8,27	33,12	15,27	0	111	25
35	C	3,56	2,2	4,54	8,99	36,85	17,99	0	144	30
940	C	2,68	2,02	4,26	7,36	33,23	14,62	3	117	27

Tabella 13: Gruppi C (CL ciclici a 21 giorni)

Confronto gruppo A-C:

Dopo aver eseguito l'analisi di statistica descrittiva per ogni singolo gruppo sono stati confrontati il **gruppo A (n=21)** con il **gruppo C (n=21)** (CL gravidici a 21 giorni, CL ciclici a 21 giorni)(Tabella 14):

	Gravida	Non gravida	SEM	p-value
DL, cm	2,936	3,024	0,064	0,502
DT, cm	2,168	2,084	0,045	0,353
Area, cm ²	4,311	4,217	0,157	0,769
Perimetro, cm	7,813	7,81	0,144	0,992
Media	38,811	35,967	0,936	0,130
Eterogeneità	16,595	16,46	0,480	0,890
Moda	32,952	28,905	1,288	0,117

Tabella 14: Analisi statistica del confronto CL tra il gruppo gravide e non gravide a 21 giorni post FA

Dal confronto non sono emerse differenze statisticamente significative in termini di dimensioni e ecogenicità (per ogni singolo parametro esaminato).

Confronto gruppo A1-B:

Dall'analisi statistica tra il **gruppo A1 (n=14)** e **gruppo B (n=14)**, dunque tra i corpi lutei gravidici a 21 e 31 giorni, è risultata una differenza statisticamente significativa solo per il parametro DT (diametro trasversale) tra i 21 e 31 giorni (Tabella 15).

	Gravida 21	Gravida 31	SEM	p-value
DL, cm	2,956	2,957	0,07923	0,997
DT, cm	2,211	2,28	0,05331	0,526
Area, cm ²	4,174	4,748	0,16207	0,076
Perimetro, cm	7,809	7,969	0,15535	0,617
Media	39,293	40,995	1,20026	0,489
Eterogeneità	17,204	17,779	0,59749	0,639
Moda	32,929	34,357	1,82807	0,704

Tabella 15: Analisi statistica del confronto tra i CL gravidici a 21 e 31 giorni.

L'area dei CL a 21 giorni e 31 giorni presenta una differenza tendenzialmente statisticamente significativa (p value = 0,076).

Per il parametro DT (cm) è stata individuata una correlazione ed è stata testata analizzata tramite regressione lineare. I risultati hanno dimostrato di essere ben descritti da una funzione polinomiale descritta dall'equazione: $y = 2,0789x^2 - 8,0405x + 9,8228$ ($R^2 = 0,3256$) (p value = 0,049) (Figura 18).

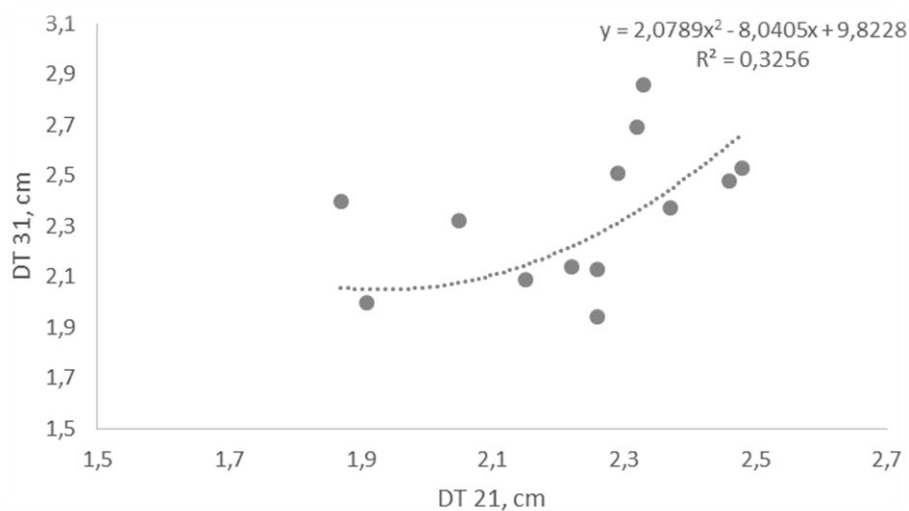


Figura 18: Grafico rappresentativo della funzione polinomiale che descrive la variazione del DT tra i CL gravidici a 21 e 31 giorni post FA.

Nella seguente tabella sono stati riportati i dati relativi ai CL cavitari (Tabella 16):

Identificazione		Misure CL				Valutazione Ecografica Computerizzata (0 - 255)					Casi Speciali			
N° Vacca	Gruppo	DL (cm)	DT (cm)	Area (cm ²)	Perimetro	Media	Eterogeneità	Min. Pix	Max. Pix	Moda	DL (cm)	DT (cm)	Area (cm ²)	Area Totale
153	A1	3,14	2,46	2,49	8,53	43,75	24,63	0	161	22	2,46	1,75	3,06	5,55
71	A1	3,7	1,91	3,82	8,85	44,38	17,78	0	127	36	1,97	0,85	1,49	5,31
96	A1	3,11	2,32	3,73	8,42	38,93	17,95	1	138	25	1,73	1,19	1,63	5,36
137	C	3,56	2,57	4,57	8,77	37,57	21,33	2	140	25	1,3	0,97	1,29	5,86
47	C	3,58	2,23	5,02	9,22	42,24	14,84	0	109	37	1,29	0,95	0,98	6
89	C	3,38	2,8	5,27	9,49	38,5	20,45	0	138	23	1,69	1,27	1,64	6,91
35	C	3,56	2,2	4,54	8,99	36,85	17,99	0	144	30	1,56	1	1,17	5,71
1801	C	2,72	2,27	2,16	6,88	35,85	19,83	0	111	28	1,38	1,16	1,45	3,61
1051	C	2,86	2,4	4,82	8,47	39,44	19,83	0	128	37	1,03	0,87	0,86	5,68

Tabella 16: Dati ImageJ relativi ai CL cavitari

Sono stati ritrovati 9 CL cavitari su un totale di 42 CL, dunque una prevalenza del 21,42% di CL cavitari così distribuiti tra le categorie (Tabella 17 e 18):

	Gravide		
	FA	FR	%
CL compatto	18	0,86	85,71
CL cavitario	3	0,14	14,29

Tabella 17: Frequenze assolute, relative, percentuali dei CL cavitari nel gruppo dei CL gravidici.

	Non Gravide		
	FA	FR	%
CL compatto	15	0,71	71,43
CL cavitario	6	0,29	28,57

Tabella 18: Frequenze assolute, relative, percentuali dei CL cavitari nel gruppo dei CL ciclici.

È stata riscontrata una percentuale maggiore di CL cavitari nelle bovine non gravide (28,57%).

6.4.DISCUSSIONE

Il 21°giorno post FA, nella specie bovina, rappresenta lo spartiacque tra due estremi biologici: lo stato di gravidanza ed il ritorno in calore. In caso di successo del riconoscimento materno, questo rappresenta l'inizio della placentazione. Al contrario, se non vi è stato il riconoscimento materno (a causa del fallimento dell'FA, ambiente uterino depauperato, morte embrionale precoce) segna il ritorno in estro.

I risultati ottenuti dallo studio sono:

1. Prevalenza maggiore del CL sull'ovaio di destra;
2. Vi è tendenzialmente una differenza nel confronto ECO+ e non gravida;
3. Non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa in termini di area, perimetro e diametro tra i CL di 21 giorni ciclici e gravidici;
4. Non è stata riscontrata una differenza significativa in termini di ecogenicità (Valore Medio Pixel, Eterogeneità) tra i CL a 21 giorni ciclici e gravidici;
5. Non è risultata esserci una differenza in termini di ecogenicità tra i CL gravidici a 21 e 31 giorni;
6. È stata riscontrata una differenza tra il DT a 21 giorni e il DT a 31 giorni dei CL gravidici, descritta da regressione di tipo polinomiale;
7. L'area tra i CL gravidici a 21 e 31 giorni è risultata tendenzialmente significativa (p value = 0,076);
8. Il 21,42% dei CL (9/42) era cavitario, è stata riscontrata una maggiore prevalenza di CL cavitari tra le bovine non gravide (28,57%).

I CL sono stati osservati nell'ovaio di destra nel 75% dei casi, sia nelle bovine gravide che in quelle non gravide. Questo dato è sovrapponibile a quanto riportato in bibliografia. Infatti, come riportato da Stevenson, l'ovulazione avviene più frequentemente sull'ovaio di destra, con una variazione che va dal 60% al 65% (Stevenson, 2019), così come il 60% circa delle gravidanze si sviluppa nel corno di destra (Noakes, 2018). Anche uno studio di Siqueira et al., svolto su manze incrociate con *Bos taurus indicus*, ha ottenuto una prevalenza del 66% del CL sull'ovaio di destra (Siqueira L. T., 2009).

La correlazione tra "ECO +", dunque il minor punteggio assegnato all'ecogenicità dall'operatore, e lo stato di non gravidanza, è tendenzialmente significativa (p value = 0,106), tuttavia questo

risultato è da considerare preliminare, in accordo all'esiguo numero di animali arruolati. Infatti, come indicato da Brito et al., per questo genere di studi che mettono a confronto immagini ecografiche con diversi metodi, sarebbe opportuno avere un maggior numero di individui arruolati. Un campione di almeno 100 animali è necessario per un ottimale accuratezza nella valutazione della coerenza dei risultati (Brito, 2022).

Non sono risultate differenze statisticamente significative per quanto riguarda le dimensioni dei CL ciclici e gravidici a 21 giorni (Area, p value = 0,769), contrariamente a quanto dimostrato in letteratura. Infatti, uno studio di Scully et al., che ha preso in considerazione un campione di 171 vacche non gravide e 173 vacche gravide, ha riscontrato che l'area del tessuto luteinico di vacche gravide, fosse maggiore rispetto a quelle non gravide nell'intervallo dai 18 ai 21 giorni post FA (Scully, 2014). Anche Siqueira et al., ha confrontato le caratteristiche morfologiche del CL tra i 12 e i 20 giorni post FA in 247 vacche (*Gir X Holstein*), ottenendo una differenza tra le aree dei CL a 20 giorni post FA. I CL di vacche gravide avevano un'area di dimensioni medie maggiore rispetto ai CL delle bovine non gravide (Siqueira L. A., 2019). Vi è una tale differenza tra le aree dei CL gravidici e ciclici poiché l'area del tessuto luteinico è altamente correlata alla produzione di P4 (Siqueira L. A., 2019). Tuttavia, Noakes et al., definiscono le differenze tra le dimensioni medie dei CL gravidici e ciclici inferiori alla variabilità individuale; quindi, la dimensione del CL non dovrebbe essere considerata un carattere distintivo dello "stato" di gravidanza. Le dimensioni del CL assumono un valore predittivo positivo, solo se considerate in associazione al livello di progesterone, percentuale di vascolarizzazione del CL ed ecogenicità dell'utero, come descritto da Scully et al (Scully, 2014).

Nel presente studio, non è risultata alcuna differenza significativa riguardo l'ecogenicità (Mean Value Pixel, Eterogeneità), sia tra i CL gravidici e ciclici a 21 giorni, sia tra i CL gravidici a 21 e 31 giorni. Questo risulta essere in accordo ai precedenti studi. Infatti, Scully et al., afferma che non vi è differenza tra i gruppi di bovine gravide e non gravide per quanto concerne l'ecogenicità (definita con i parametri di omogeneità e contrasto) tra i 18 e i 21 giorni post FA (Scully, 2014). Anche Siqueira et al., conclude che l'ecogenicità (Mean pixel Value) non è un indicatore utile dei cambiamenti funzionali che incorrono nel CL nella bovina (Siqueira L. A., 2019).

Per quanto riguarda l'area dei CL a 21 giorni e 31 giorni è risultata esserci una differenza tendenzialmente significativa (p value=0,076) tra i due gruppi, questo parametro andrebbe rivalutato utilizzando un campione maggiore. La variazione tra i diametri trasversi (DT) dei CL

gravidici a 21 e 31 giorni è descritta da una relazione di tipo polinomiale. Dopo un'attenta consultazione bibliografica, non sono stati trovati riscontri nella valutazione del variare delle dimensioni in termini di area e diametro nell'intervallo tra i 21 e 31 giorni post FA.

La frequenza dei CL cavitari in questo studio è stata del 21,42%, leggermente minore rispetto alle frequenze riportate nello studio di Jaskowski et al., dove la frequenza è stata del 32,7% (Jaskowski, 2021) e molto inferiore rispetto al 37,2% della frequenza riportata da Kito et al. Dal confronto tra i valori medi di ecogenicità del tessuto luteale di CL compatti e cavitari non sono emerse differenze (Kito, 1986), come riportato in bibliografia.

CONCLUSIONI

Considerando i risultati ottenuti dalla rielaborazione dei dati, ottenuti in campo e dai dati acquisiti tramite software non è stato possibile evidenziare una differenza statisticamente significativa tra i corpi lutei ciclici e gravidici a 21 giorni post FA. Tuttavia, è stata identificata una differenza significativa tra i diametri trasversali dei CL a 21 giorni e 31 giorni di vacche gravide. La relazione tra questi due gruppi è stata testata tramite regressione lineare.

Questo lavoro offre una buona base preliminare per altri studi sull'argomento. Infatti, risulterebbe interessante, attuare uno studio finanziato, con un campione più significativo formato da gruppi più omogenei e utilizzando tecniche di sincronizzazione degli estri, così da ridurre errori legati alla variabilità individuale.

Inoltre, risulta necessario valutare in associazione più parametri (dimensioni, ecogenicità, vascolarizzazione del CL in relazione ai livelli di progesterone ematici o nel latte) includendo nello studio l'utilizzo di test biochimici e del color doppler. Non meno importante, questa indagine ha permesso di acquisire competenze trasversali, relative non solo alla pratica buiattrica ma anche all'utilizzo di software per l'analisi di immagini, che si sono dimostrati strumenti da tenere in considerazione per eventuali valutazioni predittive.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, G. J. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 72-80.
- Aerts, J. B. (2010). Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reproduction of Domestic Animals*.
- Balhara, A. G. (2013). Early Pregnancy Diagnosis in Bovines: Current Status and Future Directions. *The Scientific World Journal*.
- Barone, R. (2003). *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*. Edagricole.
- Bottarelli, F. (1989). *Fertilità e ipofertilità bovina*. Tep. Veterinaria.
- Brito, S. d. (2022). Evaluation of ImageJ software in ultrasonic image analysis: Follicular and luteal morphological characteristics of cattle. *Animal Reproduction Science*.
- Carovac, A. S. (2011). Application of Ultrasound in Medicine. *Acta Infrom Med*, 168-171.
- Carrière, P. G. (2010). Bovine ovary. In L. C. DesCoteaux, *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography* (p. 35-44). Wiley-Blackwell.
- Christiansen, D. (2021). Examination for Pregnancy: Rectal Palpation. In R. Hooper, *Bovine Reproduction - Second Edition* (p. 471-477). Wiley Blackwell.
- Colloton, J. (2021). Ultrasound evaluation of the Female Reproductive Tract. In R. Hooper, *Bovine Reproduction* (p. 432-450). Wiley Blackwell.
- Crowe, M. (2022). Reproduction, Events and Management: Estrous Cycles Characteristics. In M. Crowe, *Encyclopedia of Dairy Sciences - Third Edition* (p. 948-953). Paul L.H. Mc Sweeney and John P. Mc Namara.
- De Rensis, F. A. (1998). Il rilevamento dell'estro ed induzione dell'ovulazione . *Large Animals Review*.
- Dempsey, A. (2021). Examination for Pregnancy: Biochemical tests. In R. Hooper, *Bovine Reproduction - Second Edition* (p. 479-483). Wiley Blackwell.

- DesCoteaux, L. G. (2021). *Practical Atlas of Ruminant and Camelid reproductive Ultrasonography*. Wiley-Blackwell.
- Drost, W. (2013). Physics of Ultrasound Imaging. In *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology - Sixth Edition* (p. 38-48). Elsevier.
- Fields, M. (1996). Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology*, 1295-1325.
- Filotto, U. (1996). Anatomia genitale femminile. In G. Sali, *Manuale di teriogenologia bovina*. Edagricole.
- Gayard, V. C. (2010). Principles and Recommendations, essential Concepts, and common Artifacts in Ultrasound Imaging. In L. C. DesCoteaux, *Practical Atlas of Ruminant and Camelid Reproductive Ultrasonography* (p. 21-35). Wiley-Blackwell.
- Gibbons, J. W. (1999). Relationship between Follicular Development and the Decline in the Follicle - Stimulating Hormone Surge in Heifers. *Biology of Reproduction*, 72-77.
- Ginther, O. K. (1989). Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology of reproduction*.
- Gnemmi, G. (2013). Ultrasonografia in ginecologia buiatica. In G. Sali, *Gestione clinica della riproduzione bovina* (p. 69-90). Point Veterinaire Italie.
- Gnemmi, G. M. (2007). Rilevazione del calore nella bovina: nuovi approcci a un vecchio problema. *Summa*.
- Hafez, B. H. (2000). *Reproduction in farm animals - 7th Edition*. Blackwell Pub.
- Hanzen, C. P. (2000). Relative accuracy of the identification of ovarian structure in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. *The Veterinary Journal*, 161-170.
- Jaskowski, M. B. (2021). Ultrasound Characteristics of the Cavitary Corpus Luteum after Oestrus Synchronization in Heifers in Relation to the Results of Embryo Transfer. *Animals*.
- Kastelic, J. (1990). Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. *Theriogenology*, 487-498.

- Kito, S. O. (1986, February). Study on the appearance of the cavity in the corpus luteum of cows using ultrasonic scanning. *Theriogenology*, p. 225-352.
- König, H. E.-G. (2020). *Anatomia degli animali domestici*. Piccin.
- Liebich, H.-G. (2012). *Istologia e anatomia microscopica dei mammiferi domestici e degli uccelli*. Piccin.
- Lucy M, G. J. (2011). *Pregnancy determination in cattle: A review of available alternatives*. Joplin, MO: College of Veterinary Medicine University of Missouri, Columbia.
- Maffeo, G. G. (1992). La riproduzione. In G. B. Aguggini, *Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. Utet.
- Mann, G. (2009). Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Animal reproduction Science*.
- Milvae, R. H. (1996, May 1). Luteotropic and luteolytic mechanism in the bovine corpus luteum. *Theriogenology*, p. 1327-1349.
- Noakes, D. P. (2018). *Veterinary Reproduction and Obstetrics - 10th Edition*. Elsevier.
- Pierson, R. G. (1988, January). Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, p. 21-37.
- Pieterse, M. (1989). Ultrasonic characteristics of physiological structures on bovine ovaries. In M. Taverne, & A. Willemse, *Diagnostic Ultrasound scanning of the ovaries* (p. 53-65). Kluwer Academic Publisher.
- Popesco, P. (1997). *Atlante di anatomia topografica degli animali domestici*. Nuova Editoriale Grasso.
- Richter, J., & Gotze, R. (1986). *Ostetricia veterinaria*. Casa Editrice Ambrosiana.
- Sali, G. (2013). *Gestione clinica della riproduzione bovina*. Milano: Point Veterinaire Italie.
- Scully, S. B. (2014). Early pregnancy diagnosis on days 18 to 21 postinsemination using high-resolution imaging in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*.
- Shemesh M, M. D. (2001). Functional importance of bovine myometrial and vascular LH and cervical FSH receptors. *Seminar in Reproductive Medicine*, 87-96.

- Shirasuna, K. N. (2012). Vascular and immune regulation of corpus luteum development, maintenance, and regression in the cow. *Domestic Animals Endocrinology*, 198-211.
- Siqueira, L. A. (2019). Vascular and morphological features of the corpus luteum 12 to 20 days after timed artificial insemination in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 5612-5622.
- Siqueira, L. T. (2009). Interrelationships among morphology, echotexture, and function of the bovine corpus luteum during the estrus cycle. *Animal REproduction Science*, 18-28.
- Sjaastad, V. H. (2003). *Fisiologia degli Animali Domestici*. Casa Editrice Ambrosiana.
- Stevenson, J. (2019). Spatial relationship of ovarian follicles and luteal structures in dairy cow subject to ovulation synchronization: Progesterone and risk for luteolysis, ovulation, and pregnancy. *Journal of Dairy Science*, 5686-5698.
- Youngquist, R. (2007). Pregnancy Diagnosis. In R. Youngquist, & T. W.R, *Current Therapy in Large Animal Theriogenology* (p. 294-297). Saunders.