

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE E
FARMACOTOSSICOLOGICHE VETERINARIE

(COORDINATORE : PROF. PAOLO CIARAMELLA)

LA DIMENSIONE FRATTALE COME PARAMETRO CLASSIFICATIVO DEGLI
OVOCITI NELLA SPECIE BOVINA (BOS TAURUS) E NELLA SPECIE BUFALINA
(BUBALUS BUBALIS)

DOCENTE GUIDA

Chiar.mo Prof. : Roberto Lorizio

TESI DI DOTTORATO DELLA

Dott.ssa Carmela Acierno

XXI DOTTORATO DI RICERCA

2005-2008

INDICE

pagina

INTRODUZIONE	3
PRINCIPI DI GEOMETRIA FRATTALE	9
• <i>Dimensione Frattale</i>	20
• <i>Metodi Misurazione della Proprietà Frattale</i>	23
APPLICAZIONI DI GEOMETRIA FRATTALE	33
• <i>Neuroni e Cellule Gliali</i>	34
• <i>Citologia cervicale esfoliativa</i>	40
MATERIALI E METODI	
• <i>Recupero degli ovociti</i>	45
• <i>Classificazione</i>	47
• <i>Valutazione della Morfologia Citoplasma</i>	51
RISULTATI	53
CONCLUSIONI	57
BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUZIONE

Le tecniche legate alla riproduzione assistita nelle diverse specie animali, hanno subito un notevole sviluppo negli ultimi anni al fine di ottenere una progenie più numerosa sia da animali geneticamente migliori che da soggetti con fertilità ridotta o compromessa o da animali appartenenti a specie a rischio di estinzione.

In questo contesto un ruolo importante è occupato dalla produzione di ovociti tramite maturazione in vitro (IVM) e dalla produzione embrionale in vitro (IVEP).

In base all'aspetto microscopico del loro citoplasma, di solito gli ovociti, nelle diverse specie animali, vengono soggettivamente classificati in diversi sottogruppi, in relazione alla maggiore o minore capacità di sviluppo (*Boni et al. 2002; Dell'Aquila et al. 1997; De Vico et al., 2005;*).

La qualità degli ovociti, che è il principale fattore che influenza l'efficienza IVEP nella maggior parte delle specie, gioca nel bufalo

un ruolo ancora più importante, riducendo ulteriormente la disponibilità degli elementi adatti all'IVEP.

L'aspetto morfologico dell'ovocita riflette, infatti, con una certa attendibilità, la competenza allo sviluppo dello stesso (Neglia *et al.*, 2003).

Le informazioni strutturali morfologiche relative alla diagnosi o utili per valutare la capacità di sviluppo in vitro dell'ovocita, sono acquisite principalmente mediante l'ispezione visiva soggettiva, che tiene conto dell'aspetto del citoplasma e dei diversi strati del cumulo (Boni *et al.*, 2002; Chauhan *et al.*, 1998; Hazeleger *et al.*, 1995; Neglia *et al.*, 2003). Questo metodo conduce invariabilmente a risultati che non sono del tutto oggettivi.

All'esame microscopico convenzionale, gli ovociti rivelano un'apparenza molto complessa del citoplasma, dovuta alla diversità di apporto di goccioline lipidiche distribuite nel quadro intracellulare delle membrane e degli organelli altamente collegati di morfologia irregolare (De Vico *et al.*, 2005;).

L'aggettivo irregolare indica un attributo qualitativo caratteristico della forma di ciascun ente naturale, ivi compresi quelli biologici (*Muzzio et al., 1999*).

Una montagna, una nuvola, un sasso, sono esempi di enti naturali la cui forma è altamente irregolare, con un grado strettamente dipendente dalla scala di osservazione. L'albero vascolare, il trabecolato osseo, una cellula nervosa con le sue espansioni dendritiche, o anche la membrana plasmatica sono classici esempi di enti biologici animali la cui forma è caratterizzata dall'essere irregolare. In termini geometrici, l'aggettivo irregolare significa non soddisfacente la regolarità e la linearità che rappresentano due proprietà canoniche degli enti geometrici euclidei (*Muzzio et al., 1999*).

La geometria Euclidea, esempio di rigore e chiarezza sino alla fine del XVIII secolo, periodo in cui dagli studi di *Saccheri*, *Lobacevsky*, *Bolyai* e *Rieman* nacquero le cosiddette geometrie non-euclidee, definisce solo in modo estremamente approssimato l'oggetto studiato (*Bassingthwaighte et al., 1994; Lobacevsky 1974; Muzzio et al., 1999*).

Tale approssimazione deriva dalla rigidità delle misure lineari riferite ad oggetti naturali per i quali l'irregolarità e la complessità della forma e del comportamento sono caratteristiche fondamentali (Muzzio et al., 1999).

In questo contesto, i soli strumenti di analisi morfometrica convenzionale basati su logiche euclidee potrebbero fornire risultati piuttosto ambigui perché inadeguati a descrivere quantitativamente, le proprietà dimensionali morfologiche delle componenti irregolari delle cellule (Losa et al., 1996; Losa, 2002).

Si deve tuttavia a *Benoit Mandelbrot*, matematico francese di origine polacca, l'introduzione di un nuovo metodo di osservazione, misurazione ed interpretazione dell'eterogeneo mondo delle forme naturali (Mandelbrot 1967; 1977; 1983;).

Egli nel 1975 coniò il termine *frattale* dall'aggettivo latino *fractus*, che vuole dire rotto, frammentato, irregolare, indicando con esso tutti gli oggetti naturali. Il termine frattale ha significato opposto al termine di frazione, elemento identico, ripetitivo in cui la geometria euclidea scompone i propri enti.

Gli oggetti frattali sono caratterizzati da struttura *auto-simile*, cioè con l'aumentare dell'ingrandimento con cui vengono osservati risultano sempre costituiti da parti frazionali non eguali ma con la medesima complessità. Essi hanno inoltre forma complessa e dimensione non intera (frazionaria) che si colloca tra due dimensioni intere definite dalla geometria euclidea. La geometria che si occupa degli enti naturali prende quindi il nome di geometria frattale o anche geometria della natura (*Mandelbrot, 1983*).

Negli ultimi anni la geometria frattale ha trovato impiego sempre maggiore nelle scienze naturali e biologiche come strumento matematico, utile alla modellazione in modo semplice ma efficiente di un gran numero di forme viventi e dei loro comportamenti complessi (*Cross, 1997; Dioguardi et al., 1999; Losa et al., 1992; Losa, 1995; Losa et al., 1996; Muzzio et al., 1999; Nonnenmacher et al., 1994; West et al., 1999*).

La geometria frattale scoperta da *Mandelbrot (1983)* può essere dunque un mezzo appropriato per spiegare quantitativamente contorno, lunghezza, superficie ed altri parametri dimensionali, quasi tutti irregolari e morfologicamente complessi, dei tessuti

biologici (Losa, 2002). Strutture frattali sono state ampiamente documentate nei tessuti biologici e perfino a livello sub-cellulari. Recentemente, De Vico et al. (2005), hanno anche dimostrato che il citoplasma degli ovociti di gatta osservato al microscopio ottico presenta delle proprietà frattali, ed hanno suggerito che la quantificazione della *Dimensione Frattale* del citoplasma di tali ovociti potrebbe essere utilizzata quale parametro diagnostico nell'individuazione di elementi con più alta capacità maturativa o più adatti alla fecondazione in vitro.

Scopo del nostro lavoro è stato quello di valutare la dimensione frattale (*FD*) del citoplasma in diversi gruppi di ovociti di bovino e bufalo al fine di individuare un metodo obbiettivo e riproducibile per la descrizione morfologica e la classificazione del citoplasma nelle diverse categorie note di ovociti in queste specie.

In tal modo si spera di fornire un metodo di quantificazione che insieme ad altri parametri morfologici noti possa contribuire all'identificazione di ovociti con maggiore capacità maturativa.

PRINCIPI DÌ GEOMETRIA FRATTALE

Mandelbrot nel 1977 pubblicò “*Frattali: forma possibilità e dimensioni*” che segnò l’inizio di un nuovo tipo di studi delle strutture naturali. Mandelbrot ci ha fornito tre definizioni di frattale:

- la prima deriva intuitivamente dall’etimologia del termine frattale: *fractus* irregolare e *frangere* come frammento o frazione.
- La seconda introduce il concetto di auto-similarità: un frattale è un oggetto con una forma fatta di parti simili in qualche maniera all’oggetto intero.
- La terza è quella accettata tecnicamente. Un frattale è un oggetto con una dimensione di Hausdroff maggiore della dimensione topologica:

$$D_H > D_T$$

L’interpretazione fornita da *Mandelbrot (1977)* circa la geometria frattale, ha influenzato molto il metodo secondo il quale noi oggi descriviamo il design geometrico dei sistemi viventi, in pratica cosa forma la geometria della vita.

La proprietà fondamentale di una struttura frattale è la propria modalità scalare, come rappresentato dalla *curva di Koch*, la cui costruzione sequenziale è illustrata nella *figura 1*: al punto *a* una linea dritta costituisce l'oggetto iniziale; al punto *b* si vede emergere dal centro un triangolo equilatero; l'immagine prodotta al punto *c* mostra la sequenza di triangoli equilateri in ogni mezzo dal segmento della linea; se continuassimo con questo processo avremmo, infine, una curva dai margini molto complessi, come illustrato al punto *d* (Cross 1994).

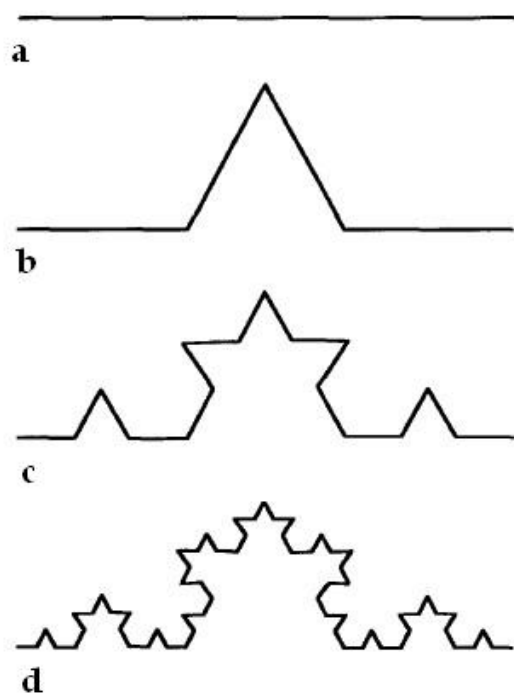


Figura 1 - Costruzione della Curva di Koch

Queste figure mostrano le proprietà dell' *auto-similarità* per le quali si ottengono triangoli equilateri di diverse misure in funzione degli step per il procedimento di costruzione.

Al punto *b*, vediamo che la lunghezza dell'oggetto è di $4/3$ rispetto a quelli della retta del punto *a*; quello del punto *c* ha una lunghezza di $(4/3)^2$ rispetto alla linea retta della figura *a*, dopo *n* interazioni avremo una lunghezza di $(4/3)^n$ e se, perciò, prolungassimo il procedimento per un numero infinito di volte avremmo una lunghezza di $(4/3)^\infty$ alla infinito (*Cross, 1994*).

La determinazione della lunghezza della curva di Koch può essere infinita ma ci sono altre valutazioni quantitative che possono fornire indicazioni sulla misura, sulla complessità o sullo spazio da essa occupato.

I matematici hanno a lungo studiato i margini complessi con proprietà frattali (*Cross, 1994*), il lavoro fu rivisto da *Benoit Mandelbrot*, il quale suggerì la dimensione frattale come la soluzione al problema della misura della lunghezza assoluta dei margini degli oggetti frattali (*Mandelbrot, 1983*). Egli ha dimostrato che la

lunghezza dei margini di un oggetto frattale può essere espressa da una legge omogenea del tipo:

$$L(r) = N \cdot r^{D_H}$$

dove $L(r)$ è la lunghezza misurata utilizzando linee rette di lunghezza r , N è il numero dei segmenti necessari a coprire l'intero margine e D_H è un esponente detto *Dimensione Hausdorff* (matematico tedesco Felix Hausdorff). Applicando i limiti a questa relazione, abbiamo:

$$D_H = \lim_{r \rightarrow 0} \frac{\log N}{\log \left(\frac{1}{r}\right)}$$

così per n movimento della curva di Koch la curva $r = r_0/3^n$ e il numero dei segmenti N è proporzionale a 4^n :

$$D_H = \frac{\log 4}{\log 3} = 1.26$$

Questa dimensione di numeri non interi contrasta con la gran parte dei sistemi geometrici, come quello euclideo, che nonostante le dimensioni intere dà un indizio sulla complessità o sulla capacità di occupare lo spazio della curva di Koch (Mandelbrot, 1983).

Nonostante la dimensione di Hausdroff possa essere vista come una proprietà matematica astratta, ad alcuni osservatori può dare ad intendere la curva di Koch come una più complessa struttura nello spazio piuttosto che come una linea euclidea (*con dimensione topologica 1*) che copre totalmente un'area del piano (*con dimensione topologica 2*).

Il valore della dimensione di Hausdroff si estende sempre tra la dimensione topologica dell'oggetto e la dimensione topologica dello spazio nel quale è posto. Più è alto il valore della dimensione di Hausdroff, più complesso è il margine dell'oggetto (*Mandelbrot, 1983*).

La relazione tra la dimensione topologica e la dimensione di Hausdroff di un oggetto, fornisce la definizione matematica formale di un oggetto frattale in cui la dimensione di Hausdroff eccede la dimensione topologica.

La dimensione di Hausdroff è una delle dimensioni che può essere usata per descrivere le strutture frattali.

E' interessante confrontare le proprietà della curva di Koch con quelle di un oggetto di un sistema geometrico intero - dimensionale come il cerchio euclideo (*Mandelbrot, 1983*).

Se consideriamo i margini di un cerchio e ne valutiamo le proprietà matematiche della lunghezza ma non della larghezza, li vedremo lisci e piani e la circonferenza ci sarà data dal suo diametro moltiplicato per π .

All'aumentare dell'ingrandimento non c'è un incremento di complessità del margine e la lunghezza del margine $L(r)$, data dall' N numero di linee rette r necessarie per coprire l'intera lunghezza, è data da :

$$L(r) = N \cdot r$$

di conseguenza non c'è relazione di legge di potenza.

Il valore della dimensione frattale dell'oggetto geometrico euclideo sarà sempre uguale alla sua dimensione topologica (*Cross, 1994*).

Le sequenze frattali discontinue sono descritte dalla *serie di Cantor*. Questa serie si basa su un metodo di costruzione simile a quello della curva di Koch, ma invece di creare un triangolo equilatero nel centro, il segmento centrale è cancellato (*Figura 2*).

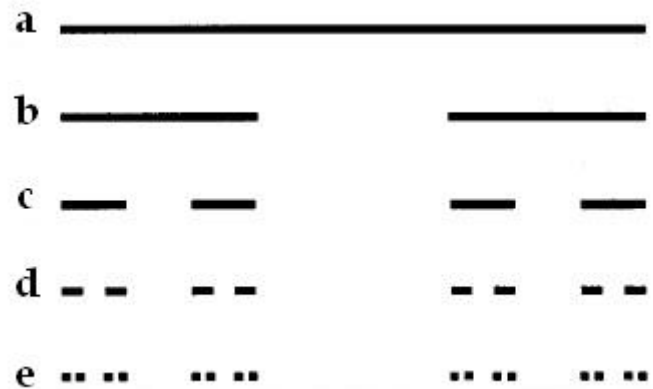


Figura 2 - Serie di Cantor

La ripetizione del processo all'infinito produce una serie di punti infinita nel numero e non misurabile nella lunghezza. Per queste caratteristiche la *serie di Cantor* rappresenta un'altra struttura che non può essere descritta utilizzando la geometria dimensionale intera (Cross, 1994).

La dimensione di Hausdroff invece, può essere applicata a questa struttura, e dopo n numero di ripetizioni avremo $N = 2^n$ di segmenti, ciascuno con lunghezza $r = (1/3)^n$, tale che:

$$D_H = \frac{\log 2}{\log 3} = 0.63$$

Questa dimensione frazionaria ha una qualche correlazione con la valutazione intuitiva dell'insieme, poiché sembra occupare più

spazio di un singolo punto (*con dimensione topologica 0*) ma non forma una linea continua (*dimensione topologica 1*) (Cross, 1994).

Un esempio bidimensionale di una serie frattale discontinua ed attinente alle immagini microscopiche, può essere illustrata dal *triangolo di Sierpinski*. Questo oggetto si forma partendo da un triangolo equilatero, con una zona interna nera (*Figura 3a*), dalla cui area viene rimosso un elemento triangolare che verrà collocato al centro ma disposto in maniera invertita (*Figura 3b*).

Questo processo si ripete per tutti i triangoli neri che ne risultano (*Figura 3c; 3d*).

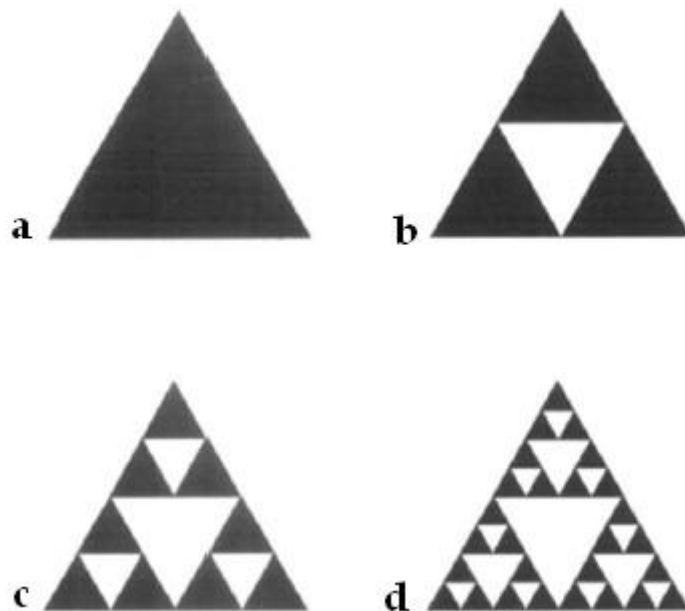


Figura 3 - Costruzione del triangolo di Sierpinski

Dopo n numero di ripetizioni, avremo $N = 3^n$ triangoli, ciascuno con lato di lunghezza $r = r_0 (2^{-n})$ e la Dimensione di Hausdroff sarà:

$$D_H = \frac{\log 2}{\log 3} = 1.58$$

che è conforme con la valutazione soggettiva della sua proprietà di occupare lo spazio (Cross, 1994).

L'analisi geometrica frattale, al di fuori dell'area della matematica pura, può essere utile solo se le strutture naturali hanno qualche proprietà frattale. Infatti, alcune strutture naturali hanno sì delle proprietà, tuttavia diverse dalle proprietà matematiche come quelle descritte dal gerlo di Sierpinski (Cross, 1994).

Il matematico Mandelbrot (1967) esaminando la linea costiera di diversi Paesi come potenziali strutture frattali, notò che quando esaminava le diverse scale delle mappe delle coste di questi Paesi, le linee costiere avevano un livello di complessità simile assunto a diversi livelli d'ingrandimento e le forme delle baie e delle penisole erano simili anche se queste avevano differente grandezza (*auto-similarità scalare*). Egli misurò la lunghezza delle linee costiere sulle mappe usando dividendi dai punti fissati a distanze opposte. Il suo

metodo consisteva nel considerare uno dei punti dei dividendi tra quelli casualmente posti sulla linea costiera e di far ruotare il dividendo del punto considerato finché il corrispettivo del punto non incrociava la linea costiera. Tale processo poi veniva ripetuto considerando quest'ultimo punto come punto di partenza da cui ripartire e ripetere l'operazione. Si contava il numero dei divisori necessari per coprire l'intero perimetro della costa e il processo si ripeteva per diverse distanze fissate tra i punti dei divisori.

Mandelbrot notava che la distanza della costa misurata aumentava con piccole distanze tra i punti di divisione senza un limite misurabile per la distanza, similmente la *curva di Koch* può avere una lunghezza infinita per la ripetizione infinita del processo di formazione.

Era così possibile misurare la dimensione frattale (in tal caso la dimensione del divisore) ed usare questa in sostituzione ad una misura assoluta di lunghezza (*Mandelbrot, 1967*).

Tutti gli oggetti naturali sono composti da unità di base (cellule, molecole, atomi) e pertanto vi sarà un limite oltre il quale essi perderanno le loro proprietà frattali (*Cross, 1994*), ma fino a quel

limite l'analisi geometrica frattale darà la migliore descrizione delle proprietà relative alla lunghezza, all'area e al volume (*Cross and Cotton, 1992*).

DIMENSIONE FRATTALE

Un oggetto frattale può essere definito nelle sue proprietà strutturali, in modo particolare quando manca di levigatezza (Losa, 2002).

Per gli oggetti euclidei, la levigatezza osservata in una scala di osservazione può cambiare in rugosità in un'altra scala. In opposizione i frattali sono oggetti che manifestano rugosità consistente o irregolarità in ogni scala. La proprietà eccezionale dei frattali è la loro invariabilità o *auto-similarità* in ogni scala (Losa, 2002).

Un oggetto è definito "*simile a se stesso*" se ogni parte di esso è esattamente uguale all'oggetto originale dopo che questo è stato messo in scala per un fattore arbitrario. L'equazione di *Richardson Mandelbrot* fornisce le basi matematiche per capire la struttura geometrica e spaziale dei frattali e per misurarli ed interpretarli:

$$L(\varepsilon) = N(\varepsilon) \cdot (\varepsilon)$$

Dove $L(\epsilon)$ è la lunghezza (*perimetro*) del contorno cellulare o la componente cellulare in un immagine piana, (ϵ) è l'unità di misura usata per misurare il perimetro $L(\epsilon)$, e

$$N(\epsilon) = l_0^D \epsilon^{-D}$$

dove $N(\epsilon)$ è il numero di unità di misura (ϵ) necessarie per coprire il perimetro $L(\epsilon)$.

Invece l_0/ϵ è una quantità adimensionale ed l_0^D una scala di riferimento che non influenza la determinazione di D (*Losa et al. 1996*).

D è il contorno della dimensione frattale che aumenta da 1 a 2 con andamento progressivo. Inserendo:

$$N(\epsilon) = l_0^D \epsilon^{-D}$$

nell'equazione di *Richardson-Mandelbrot* si giunge alla seguente legge dimensionale, espressa in ordine di grandezza:

$$\frac{L(\epsilon)}{l_0} = \left[\frac{\epsilon}{l_0} \right]^{1-D}$$

che indica che il perimetro stimato o la lunghezza della curva $L(\epsilon)$ cambia come in funzione della scala unità di misura (ϵ) .

L'esponente dimensionale $[D]$ è la dimensione frattale che definisce la natura della curva e può essere derivata dalla determinazione della pendenza $[1-D]$ della linea retta ottenuta dall'equazione logaritmica:

$$\log \left[\frac{L(\varepsilon)}{l_0} \right] \text{ verso } \log \left[\frac{\varepsilon}{l_0} \right]$$

quindi l'equazione:

$$\frac{L(\varepsilon)}{l_0} = \left[\frac{\varepsilon}{l_0} \right]^{1-D}$$

può essere riscritta dalla trasformazione logaritmica:

$$\log \left[\frac{L(\varepsilon)}{l_0} \right] = (1 - D) \log \left[\frac{\varepsilon}{l_0} \right]$$

METODI DI MISURAZIONE DELLE PROPRIETÀ FRATTALI

Il numero delle dimensioni frattali esistenti è molto ampio e vi è una certa confusione nella loro nomenclatura, tuttavia la maggior parte di esse trova applicazione solo in ambito matematico. La dimensione di Hausdorff è una delle dimensioni frattali che può essere utilizzata nella descrizione degli oggetti frattali naturali (*Falconer, 2004*).

L'auto - similarità presente negli oggetti naturali è caratterizzata da lievi fluttuazioni casuali, che non rendono possibile determinare direttamente la dimensione di Hausdorff (*Cross, 1994*).

I vari metodi di calcolo della dimensione frattale sono classificabili in due categorie:

- Con i *metodi legati alla lunghezza* si analizza il comportamento di scala di proprietà legate all'estensione spaziale (lineare, superficiale o volumetrica), con il singolo pixel dell'immagine digitalizzata dell'oggetto come unità di misura.
- Nei *metodi legati alla massa* invece il singolo pixel viene considerato come l'unità di misura della "massa" dell'oggetto e

viene analizzato il comportamento di scala di proprietà legate al numero di pixel, ovvero alla "massa" (Falconer, 2004).

La dimensione di divisione descritta da Mandelbrot (1967; 1983;) può essere calcolata come:

$$D_D = \left(\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log L(\varepsilon)}{\log(1/\varepsilon)} \right) + 1$$

dove $L(\varepsilon)$ è la lunghezza del margine misurato con il divisore di lunghezza D_D è la dimensione frattale del divisore.

Quando si valutano gli oggetti naturali, ε non può essere considerata contro il limite 0 perché la misura minima delle unità di base di questi oggetti deve essere molto più larga di questo limite e perciò un metodo alternativo può essere :

$$D_D = 1 + d$$

dove d è la pendenza del grafico del logaritmo $\log\{L(\varepsilon)\}$ verso $\log 1/\varepsilon$ (Cross, 1994).

La maggior parte dei metodi di determinazione delle dimensioni frattali sono implementati utilizzando sistemi computerizzati che

presentano i vantaggi di flessibilità e velocità di adattamento necessari ai nuovi metodi di analisi (Cross, 1994).

L'utilizzo di diverse implementazioni nella determinazione delle dimensioni frattali può essere problematico. I metodi dovrebbero essere testati sulle immagini degli oggetti frattali ed euclidei di modo che possano essere assicurate la precisione e la riproducibilità (Cross, 1994).

Nel metodo della dilatazione del pixel l'immagine da esaminare è convertita in un singolo pixel esterno e poi diversi cerchi di diverse misure (*in genere 4-128 pixels*) sono sovrapposti su ogni pixel del margine. Per ogni immagine si procede con un'operazione booleana per far coincidere le aree dei dischi adiacenti, si conta poi il numero totale dei pixels che risulta (Cross, 1994).

Il numero totale dei pixels è diviso dal diametro del disco usato e il grafico log-log derivante da questa somma è diviso per il diametro del disco, il gradiente del segmento lineare del grafico S è relazionato alla dimensione frattale da $D_D = 1 - S$.

Il metodo della dilatazione del pixel è equivalente a quello dei divisori di Mandelbrot, tuttavia esso è più facile da programmare su

sistemi computerizzati poiché non richiede nessun algoritmo per tracciare il punto successivo all'esterno della linea (Cross, 1994).

Il metodo "box-counting" consiste nel sovrapporre all'immagine una griglia quadratica (con maglie di lato r) e nel contare il numero di maglie occupate dall'oggetto, variando la dimensione delle maglie. Riportando il logaritmo del numero di maglie occupate dall'oggetto in funzione del logaritmo delle dimensioni delle maglie (numero di pixel che ne compongono il lato) si ottiene un grafico interpolabile con una retta di pendenza (negativa) S .

Tale pendenza costituisce una stima della *Dimensione di Kolmogorov* che coincide con la Dimensione di Hausdorff in condizioni isotrope ideali (Block et al., 1990; Dubuc et al., 1989).

La dimensione *box-counting* può essere calcolata come:

$$D_B = \left(\lim_{\varepsilon \rightarrow 0} \frac{\log N_{(\varepsilon)}}{\log(1/\varepsilon)} \right)$$

dove D_B è la dimensione frattale del box-counting, ε la lunghezza del lato del box ed $N_{(\varepsilon)}$ il numero più piccolo di box della lunghezza del lato, ε è usato per coprire completamente l'esterno dell'oggetto

misurato. Anche in questo caso il limite 0 non può essere applicato agli oggetti naturali, di conseguenza la dimensione è calcolata:

$$D_B = d$$

Dove d rappresenta la pendenza del grafico $\log\{N(\epsilon)\}$ verso $\log 1/\epsilon$ (Cross, 1994).

Il metodo del box-counting è schematizzato in *Figura 4*.

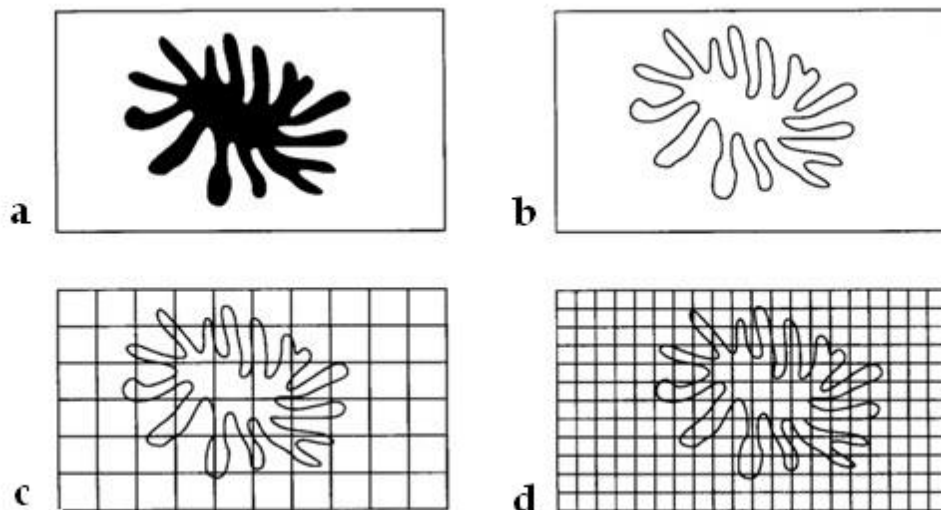


Figura 4 - Metodo Box-counting: (a) Immagine binarizzata di un oggetto; (b) Estrazione del profilo; (c-d) apposizione di griglie di diverse dimensioni (Cross 1994).

Se un oggetto naturale presenta proprietà frattali ad un certo ingrandimento, all'aumentare di questo l'immagine potrebbe rivelare ulteriori dettagli. La dimensione frattale dell'oggetto andrebbe determinata a diversi livelli d'ingrandimento, utilizzando il *metodo dei divisori* o quello del *box-counting* sulle diverse immagini (Cross, 1994).

Questi metodi tuttavia sono difficili da implementare perché ad ogni ingrandimento dovrebbe essere misurata la stessa area totale dell'immagine. Ciò vuol dire che ad ogni livello di ingrandimento dovrebbero essere evidenziati tutti i margini di ciascun campo visivo per assicurarsi che non si tralasci nessuna area, né che venga valutata due volte. In pratica, procedendo con una certa cura, si può evitare il rischio di misurazioni che utilizzano ingrandimenti "vuoti" piuttosto che un reale aumento di risoluzione.

Quando si analizza un'immagine ad un unico ingrandimento, nel calcolo della dimensione frattale, il valore di box più piccolo dovrebbe essere superiore al singolo pixel che rappresenta il limite della risoluzione del sistema (Cross, 1994).

La maggior parte degli oggetti naturali mostra struttura frattale in un determinato range di ingrandimento, che è fedelmente rispecchiata dal gradiente del segmento lineare del grafico log-log (Cross, 1994).

La dimensione frattale è solo uno degli strumenti della geometria frattale, che può dare indicazioni sulla capacità di riempimento dello spazio di un oggetto, ma non dà informazioni sul modello di compilazione dello spazio stesso. Quest'ultimo potrebbe essere descritto da un'altra dimensione, definita *lacunare* (Mandelbrot 1983), tuttavia non sono stati ancora sviluppati i metodi per applicarla agli oggetti frattali naturali.

La variazione di consistenza della composizione di un oggetto (dai valori di una scala di grigio o di colori) può essere descritta impiegando (Barlett, 1991):

$$A(\epsilon) = \lambda \epsilon^{2-Da}$$

dove $A(\epsilon)$ è l'area della superficie misurata utilizzando un quadrato dal lato lungo ϵ , λ è il fattore scalare ossia la dimensione frattale della consistenza della superficie.

La differenza tra l'altezza di pixels adiacenti, e la variazione di consistenza del tessuto è espresso da :

$$A(\varepsilon) = \sum_{x,y} \varepsilon^2 + \sum_{x,y} \varepsilon \{ \mathbf{abs}[I(x, y) - I(x + 1, y)] = \mathbf{abs}[I(x, y) - I(x + 1, y)] \}$$

dove $I(x,y)$ è l'altezza di una colonna trovata per un particolare valore di ε utilizzando valori dei pixels adiacenti per produrre blocchi con lato di lunghezza ε .

La dimensione frattale della superficie è determinata disegnando un grafico di $\log\{A(\varepsilon)\}$ verso $\log 1/\varepsilon$ e misurandone il gradiente. Questo metodo, utilizzato in radiologia, (Caldwell et al., 1990; Ruttimann et al., 1992) è applicabile ad ogni immagine che presenta variazioni interne in una scala di valori grigi.

Il mondo vivente comprende un' immensa diversità di forme e strutture, molte delle quali sono generate da processi morfogenetici irregolari. I fenomeni funzionali e metabolici, che hanno luogo negli organismi viventi, seguono dinamiche non lineari rispetto alla legge lineare di causa effetto ed avvengono in maniera irreversibile ed al contrario rispetto all' dell'equilibrio termodinamico. Gli organismi viventi dissipano energia per assicurare un' alternanza fra l'auto

perpetuazione rispetto allo stato caotico dove l'entropia è più grande della loro configurazione funzionale e morfologica (Losa, 2002).

Le parole di W. Goethe 1787 sono degne di nota in questo contesto: un albero è un essere vivente che sviluppa una serie di organi consecutivamente nel tempo che formano legami gli uni con gli altri e con l'intero organismo da un'unica ed identica idea morfogenetica.

In opposizione alla visione funzionale basata sul concetto di omeostasi linearità e reversibilità, il più recente approccio epistemologico alla natura è basato su una serie di principi coerenti forniti dalla teoria del caso e dello sviluppo, ed in questo secolo dalla geometria frattale (Losa, 2002).

Entrambi i campi hanno fornito un nuovo linguaggio matematico che rende possibile valutare, descrivere le strutture morfologiche con complesse qualità qualitative come i fenomeni umorali e fisiologici non lineari degli organismi viventi. Questo è in conflitto con l'approccio Euclideo convenzionale che è sempre preferibile per descrivere corpi geometrici ideali e fenomeni lineari (Losa, 2002).

La geometria Euclidea dà una definizione precisa del concetto di dimensionabilità: un punto geometrico possiede una dimensione 0, una linea retta 1, e un piano e uno spazio rispettivamente 2 e 3 e questo senza considerare gli intermedi.

Senza denigrare le nozioni di geometria euclidea la geometria frattale permette di utilizzare dimensioni frazionarie. Così secondo la geometria euclidea la dimensione di una curva, che sia molto o poco tortuosa, è invariabilmente 1. Intuitivamente queste curve meritano una dimensione intermedia tra 1 e 2 in ordine a quanto tendano a coprire interamente un piano (*Heymans et al., 2000*).

E' stato ipotizzato che il principio modello degli organismi viventi segue le leggi dei frattali (*Losa, 2002*).

La dimensione frattale conduce ad un approccio quantitativo di parametri che prima di oggi erano considerati astratti come l'eterogenicità, l'irregolarità o la complessità (*Heymans et al., 2000*).

APPLICAZIONI DI GEOMETRIA FRATTALE

L'esperienza sperimentale degli ultimi 10 anni ha dimostrato che tessuti biologici, modelli frattali o strutture simili possono essere quantificati solo in una scala di grandezza la cui misura deve essere stabilita sperimentalmente. All'interno di questa scala di valori, i dati sperimentali mostrano che la dimensione frattale resta costante anche se si effettuano variazioni del fattore d'ingrandimento (*Losa, 2002*).

Il primo passo nell'applicazione della geometria frattale in microscopia è stabilire se l'oggetto in questione ha una struttura frattale oltre un certo livello d'ingrandimento (*Cross, 1994*).

Un primo esame visivo può suggerire proprietà frattali attraverso l'identificazione di una *auto-similarità* o il mantenimento della complessità dei margini ad un più alto ingrandimento, successivamente bisogna verificare empiricamente misurando la dimensione frattale per dimostrare che essa è maggiore della dimensione topologica.

L'interconnessione strutturale nell'osso trabecolare potrebbe dare l'impressione di proprietà frattale, ma le trabecole hanno superfici lisce visibili al microscopio con misura della dimensione frattale è pari ad 1 (*Cross et al., 1993*), e quindi uguale alla dimensione topologica.

Questi risultati "negativi" sono importanti poiché dimostrano che le misure geometriche di dimensioni intere, possono continuare ad aversi su queste strutture quando attengono alla valutazione della patologia metabolica dell'osso (*Mosekilde, 1988*).

NEURONI E CELLULE GLIALI

L'applicazione dei metodi dell'analisi frattale allo studio della morfologia del neurone risale agli inizi degli anni 90.

La struttura ramificata dei neuroni dà l'impressione della frattalità e ne è stata dunque misurata la dimensione frattale (*Cross, 1994*).

Smith et al. (1989), hanno misurato la crescita dei neuroni del sistema nervoso centrale di vertebrati in colture cellulari. Essi avevano rilevato dimensioni frattali da 1.14 a 1.60, valori che corrispondevano alla valutazione soggettiva della complessità

dell'immagine. I neuroni con ramificazioni più alte avevano dimensioni frattali più elevate.

Un altro gruppo di ricercatori (*Porter et al., 1991*) ha misurato la dimensione frattale dei neuroni piramidali della corteccia motoria nei mammiferi, utilizzando una metodologia analoga ed ottenendo valori simili. La variazione all'interno del livello corrispondeva al tipo specifico di neurone ed era correlato all'assestamento soggettivo della complessità della diramazione.

Il primo lavoro di *Neale et al., (1993)* esaminava il cambiamento della dimensione frattale durante il primo sviluppo dei dendriti dei neuroni della corda spinale. I neuroni messi in coltura, erano prelevati dalla spina dorsale di feti di topi, resi visibile con la immunisto chimica utilizzando un frammento C della tossina del tetano e anticorpi di tossina anti-tetano. La dimensione frattale era misurata con il metodo della dilatazione del pixel. I $3/4$ dei neuroni della spina dorsale mostravano una dimensione frattale di 1.16 dopo 9 ore di coltura, che aumentava ad 1.34 dopo 164 ore di coltura, raggiungendo il picco di aumento dopo 4 giorni di coltura. Questi risultati dimostrarono che l'aumento di complessità delle

ramificazioni dei dendriti neuronali, avviene nella prima fase dello sviluppo.

Takeda et al., (1992) hanno ottenuto risultati simili, analizzando la dimensione frattale delle cellule cerebrali di Purkinje nel topo durante lo sviluppo, ed ha mostrato che la dimensione frattale cresce con la filogenesi: da 1,13 (lampreda) a 1,86 (uomo);

Montague e Friedlander (1989; 1991) diedero risultati comparabili utilizzando le cellule gangliari della retina dei gatti, private dei dendriti attraverso la triturazione e la centrifugazione.

I fattori che determinano la crescita dei neuroni sono stati studiati da *Caserta et al., (1990; 1992)* le cellule dei neuroni retinali dei polli erano coltivate a diverse concentrazioni di cellulosa metilica per ottenere colture di differente viscosità media. La dimensione frattale era calcolata impiegando il metodo della dilatazione del pixel.

Il numero di diramazioni dei neuriti contate diminuiva del 98% con un incremento della viscosità da 1 a 4.3, ma la dimensione frattale calcolata rimaneva costante in un livello di 1.0-1.2. Era inoltre possibile discriminare attraverso la dimensione frattale l'origine dei

neuroni *in vivo* ed *in vitro* ottenendo misure rispettivamente di: 1,67 per i neuroni *in vivo* e 1,39 -1,43 per quelli *in vitro* (Caserta *et al.*, 1990). Lo stesso Autore ha poi dimostrato che la dimensione frattale può essere utilizzata per classificare le diverse tipologie fisiologiche di neuroni gangliari della retina (Caserta *et al.*, 1995).

Dimensioni frattali molto basse rispetto a quelle viste da altri ricercatori (Smith *et al.*, 1989; Neale *et al.*, 1993; Morigiwa *et al.*, 1989; Wingate *et al.*, 1992), suggeriscono alcuni problemi nella metodologia dovuti presumibilmente ad una insufficiente risoluzione dell'immagine dei neuroni, al contrario di altri ricercatori che hanno sempre trovato una diretta corrispondenza tra il numero di rami dei neuriti e la dimensione frattale.

Kleinfeld *et al.* (1990), commentando il primo lavoro di Caserta *et al.* (1990), suggerisce che il basso valore della dimensione frattale potrebbe essere dovuto alle differenti capacità di sviluppo degli embrioni rispetto alla coltura dei neuroni nei mammiferi adulti. Morigiwa *et al.* (1989), misurarono la dimensione frattale della diramazione dendritica nelle cellule gangliari di ratti e gatti. La misura delle dimensioni frattali era 1.2-1.58 e indicava la

discriminazione tra ON e OFF delle cellule alfa (valore di 1.38 per le cellule ON; valore di 1.53 per le cellule OFF). Detti studi suggeriscono che la misura della dimensione frattale dei neuroni risulta utile nella classificazione di queste cellule.

Wingate et al., (1992) hanno descritto la morfologia dendritica delle cellule del ganglio della retina nel furetto, distinguendo le cellule alfa con una considerevole dimensione frattale di 1.455, significativamente diversa da quella delle cellule beta e gamma.

Tomas et al. (1992) nell'intento di quantificare il percorso di arborizzazione terminale dei nervi motori nei muscoli lenti e veloci dei mammiferi, hanno esaminato diversi parametri morfologici, inclusa la dimensione frattale.

A tal fine gli assi intramuscolari dei *M. Soleus* e *M. extensor digitorum longus* di ratto, erano colorati con il metodo *Bielchowsky-Gros silver*. Dopo aver digitalizzato l'immagine ottenuta, l'arborizzazione del nervo terminale era misurata con la dimensione di *Hausdorff-Besicovitch*. Essi scoprirono così che la dimensione frattale era di 1.54 (media 1.40-1.65) per i muscoli lenti (*m. soleus*) e 1.55 (media 1.41-1.77) per i muscoli veloci (*m. extensor digitorum longus*).

Huxlin et al., (1992) hanno misurato la dimensione frattale degli astrociti di retina nei topi utilizzando il metodo del *box-counting*.

Essi notarono che la dimensione frattale aumentava da 1.02 a 1.37 nel periodo compreso fra la 24 ora e 26 giorni post accoppiamento, correlandolo all'aumento soggettivo della complessità nella ramificazione di queste cellule.

Reichenbach et al. (1992) hanno misurato la dimensione frattale degli astrociti della neo corteccia umana, del nervo ottico del gatto e gli angoli cerebro pontili della scimmia, mediante il metodo della dilatazione del pixel.

La dimensione frattale degli astrociti protoplasmatici era di 1.6, mentre quella degli astrociti marginali era di 1.3. La misurazione dei singoli processi mostrava che i processi brevi avevano superfici complesse alte (*dimensione frattale di circa 1.4*) mentre i processi lunghi erano più lisci (*dimensione frattale di 1.1*). Gli autori interpretano questa misura a dimostrazione che la geometria delle cellule astrociti è tale da determinare sufficienti correnti spaziali K⁺ anche nei processi molto lunghi.

Smith et al., (1991) anche hanno misurato la dimensione frattale degli astrociti (nel nervo ottico di ratti neonati) utilizzando sia il metodo della dilatazione del pixel che quello del box-counting. Hanno notato che gli astrociti maturi hanno una dimensione frattale di 1.62 e gli oligodendrociti hanno un valore di 1.75.

CITOLOGIA CERVICALE ESFOLIATIVA

La citologia cervicale uterina è utilizzata come test di screening per il carcinoma della cervice uterina, tuttavia la citopatologia sarebbe utile se potesse distinguere quantitativamente tra la popolazione cellulare normale ed anormale (*Cross, 1994*).

Diversi Autori hanno usato l'analisi frattale per distinguere, mediante la colorazione di *Feulgen*, la composizione della cromatina nucleare fra cellule normali e cellule displastiche dell'epitelio cervicale. I loro risultati, ottenuti su 31 campioni, mostravano che i valori del tessuto frattale erano meno discriminanti dell'area nucleare o della densità ottica integrata del nucleo, suggerendo, dunque, che la quantità del DNA nucleare, come fattore

discriminante, è più importante rispetto alla sua distribuzione (Cross, 1994).

Gli animali chimerici sono spesso utilizzati negli esperimenti per determinare la clonabilità dei tumori, ma è stato difficile determinare la normale distribuzione delle tessere del mosaico negli organi. Alcuni *Autori* hanno misurato la dimensione frattale delle tessere del mosaico del fegato dei ratti, dimostrando che essa è compresa da 1.01 a 1.64 e mostra una certa variabilità all'interno dei singoli animali (Cross, 1994).

Gli stessi *Autori* suggeriscono che se le tessere hanno una struttura frattale è perché hanno avuto un processo di *auto-similarità* e questo è un modo per produrre strutture complesse usando una piccola quantità di codice genetico (Cross, 1994).

Altre strutture nei mammiferi, come gli alberi bronchiali ed arteriosi, hanno mostrato di avere struttura frattale e le dimensioni di questi alberi erano simili a quelle create dai processi di aggregazione a diffusione limitata che ancora suggeriscono come i processi di *auto-similarità* possano giocare un ruolo importante nello sviluppo di alcune strutture (Cross, 1994).

Keough et al., (1991) hanno mostrato che la membrana plasmatica di diversi tipi di cellule possiede una struttura frattale. Digitalizzando le *outlines* della superficie delle membrane di vari tipi cellulari, quali linfociti ed eritrociti umani e le cellule epiteliali di ratto, hanno misurato la dimensione frattale con il metodo del divisore.

Le dimensioni frattali ottenute da questi *Autori* erano simili in tutte le specie con una media di 1.13-1.17 ad eccezione degli eritrociti che hanno dimensione frattale di 1.02 conforme rispetto al loro aspetto più liscio.

Losa et al., (1992) hanno misurato la dimensione frattale delle membrane cellulari di linfociti e delle cellule leucemiche linfoblastiche.

Le membrane pericellulari delle cellule venivano visualizzate con un microscopio elettronico con fattore d'ingrandimento di x8000 e x125000. Successivamente da queste immagini digitalizzate, era calcolata la dimensione frattale con il metodo probabilistico.

La dimensione frattale delle membrane cellulari delle cellule era simile anche a diverse scale, dunque gli autori conclusero che non

esistevano strutture multi frattali. La dimensione frattale delle membrane cellulari di linfociti normali T corrisponde in media a 1.17-1.25, mentre le membrane delle cellule leucemiche sono più lisce di quelle dei normali linfociti e la dimensione frattale può essere usata come un discriminante morfometrica tra i due gruppi (*Losa et al., 1992*).

La necessità di andare oltre le descrizioni soggettive in immunologia, in oncologia morfologica, in patologia od a scopo diagnostico, ci ha portato all'adozione dei frattali per chiarire immagini al microscopio ottico, per descrivere quantitativamente caratteristiche morfo-istologiche e citologiche nel tumore al seno ed in patologie come la micosi fungoide, dermatiti croniche e molte altre condizioni patologiche come l'epitelioma cervicale squamoso, il mesotelioma maligno, l'adenocarcinoma metastatico del polmone ed il carcinoma prostatico (*Losa, 2002*).

Da quanto esposto appare chiaro come la teoria della geometria frattale coinvolge concetti semplici e che la possibilità di sistemi di analisi di immagini, basata su sistemi computerizzati con processori

veloci, consente di implementare processi analitici molto velocemente ed in modo semplice (*Cross, 1994*).

I limiti della geometria Euclidea sono ovvi se si esaminano al microscopio le immagini complesse degli oggetti naturali al cui confronto appare evidente quanti siano i vantaggi della geometria frattale, motivo per il quale essa ha trovato una larga applicazione nel campo delle scienze biomediche (*Cross, 1994*).

MATERIALI E METODI

RECUPERO DEGLI OVOCITI

- ★ Le ovaia di Bovino (N = 20) sono state prelevate al macello, poste in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/L di kanamicina a 30-35 °C e trasportate in laboratorio entro 3-4 ore dall' avvenuta macellazione.

Gli ovociti (N = 47) sono stati recuperati mediante aspirazione dei follicoli del diametro di 2-8 mm, utilizzando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione, operante a pressione negativa controllata (40-42 mm Hg).

Si è proceduto, quindi, con la valutazione morfologica dei complessi cumulo-oocita (COC) così raccolti e la loro selezione.

★ Le ovaia di bufala (N = 30), sono state prelevate al macello, poste in soluzione fisiologica antibiotata con 150 mg/L di kanamicina a 30-35 °C e trasportate in laboratorio entro 3-4 ore dall' avvenuta macellazione.

Gli ovociti (N = 63) sono stati recuperati mediante aspirazione dei follicoli del diametro di 2-8 mm, utilizzando un ago di 18 G connesso ad una pompa di aspirazione, operante a pressione negativa controllata (40-42 mm Hg).

Si è proceduto, quindi, con la valutazione morfologica dei complessi cumulo-oocita (COC) così raccolti e la loro selezione.

CLASSIFICAZIONE

Alla fase di recupero è seguita la selezione degli ovociti da sottoporre alla successiva valutazione morfologica.

Nel bovino è stata stabilita una chiara correlazione tra la morfologia dell'ovocita e la sua competenza, intesa come capacità di essere fecondato e di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti.

La morfologia dei COCs nel bovino è stata valutata secondo il metodo di *Wurth e Kruip (1992)*, tenendo conto della presenza del cumulo che circonda l'ovocita e delle caratteristiche del citoplasma, i complessi cumulo-ovocita sono stati raggruppati come segue:

★ **GRADO A:** presenza di cumulo libero e compatto e di citoplasma traslucido (*Foto 1*).

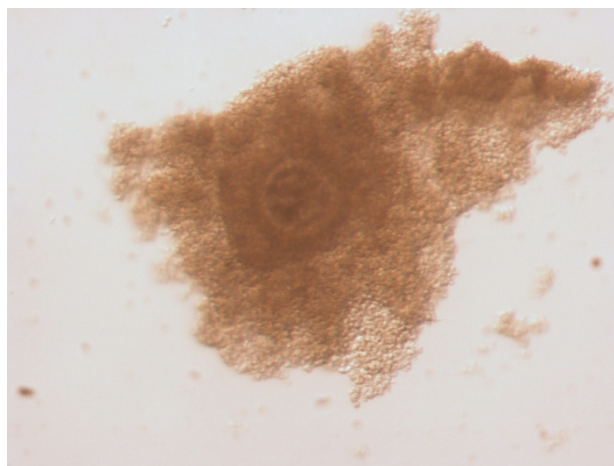


Foto 1 - Bovino Coc GRADO A

- ★ **GRADO B:** presenza di cumulo scuro e compatto e di citoplasma scuro (*Foto 2*).

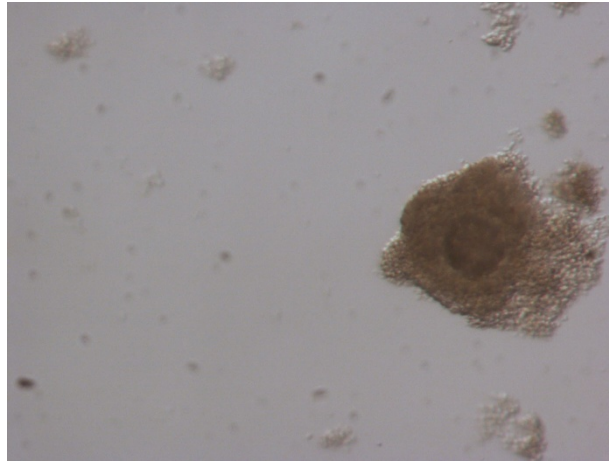


Foto 2 - Bovino Coc GRADO B

- ★ **GRADO C:** presenza di cumulo scuro ed espanso e di citoplasma scuro (*Foto 3*).

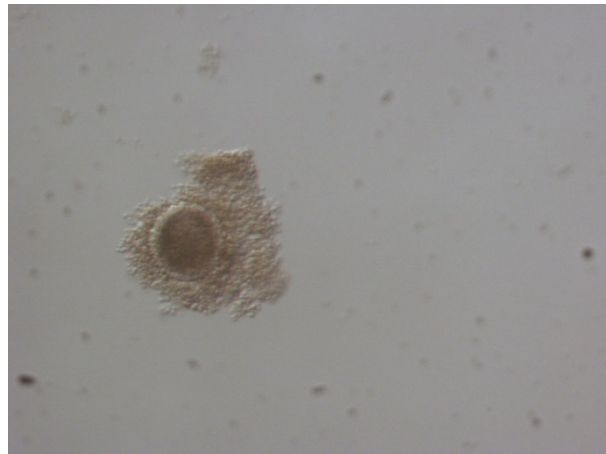


Foto 3 - Bovino Coc GRADO C

Anche per la bufala è stata stabilita una classificazione basata sulla valutazione morfologica degli ovociti che ne riflette la competenza allo sviluppo e che può essere utilizzata per prevedere la resa embrionale (*Chauhan et al., 1998; Neglia et al., 2003*) in base alla quale gli ovociti di bufala sono stati raggruppati:

- ★ **GRADO A:** con citoplasma omogeneo e ricoperti per l'intera superficie da diversi strati di cellule del cumulo (**Foto 4**).

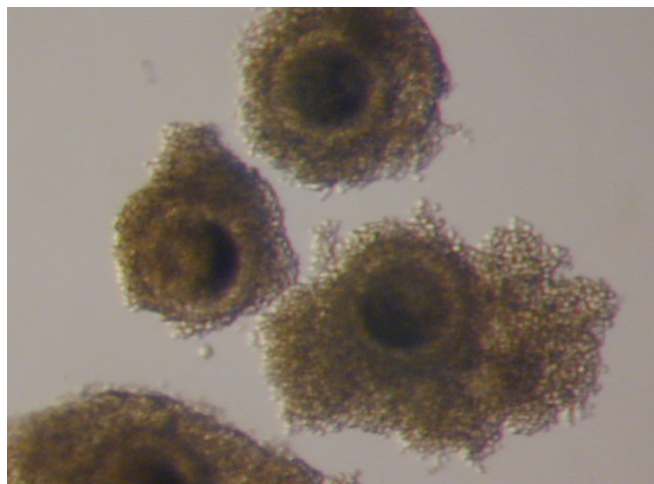


Foto 4 - Bufalo COCs GRADO A

- ★ **GRADO B:** con citoplasma omogeneo e circondati per almeno il 70 % della superficie da più strati di cellule del cumulo (**Foto 5**).

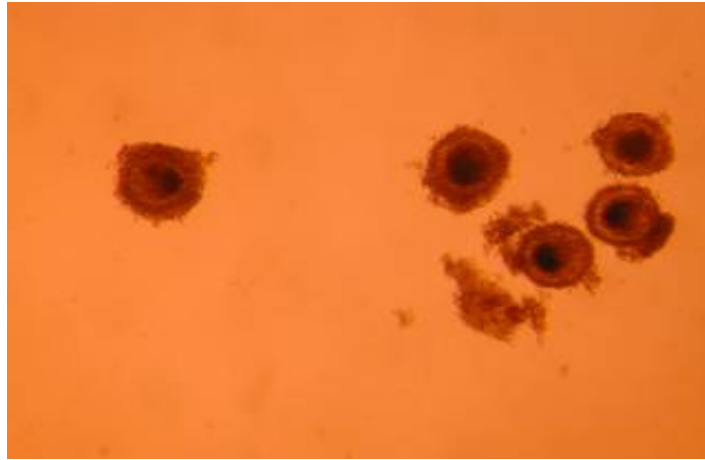


Foto 5 - Bufalo COCs GRADO B

★ *GRADO C*: con poche cellule del cumulo (*Foto 6*).

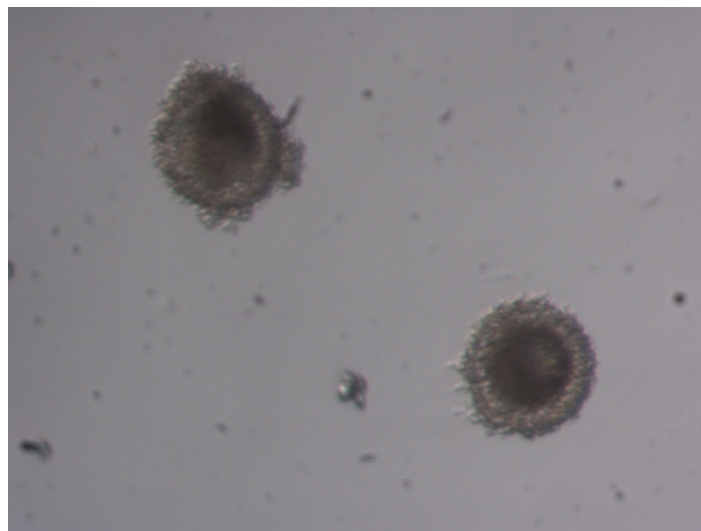


Foto 6 - Bufalo COCs GRADO C

VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA DEL CITOPLASMA

★ **Bovino:** Sono stati selezionati complessivamente *n. 47* ovociti con cumulo intatto così ripartiti nelle diverse classi: *GRADO A n. 19;*
GRADO B n.16; GRADO C n.12;

★ **Bufalo:** Sono stati selezionati complessivamente *n. 63* ovociti con cumulo intatto così ripartiti nelle diverse classi: *GRADO A n. 21;*
GRADO B n.19; GRADO C n.23;

Successivamente i complessi cumulo-ovocita di tutte le classi sono stati denudati mediante spipettamento.

Le immagini di ciascun ovocita sono state acquisite con una videocamera Nikon DS-L1 collegata ad un microscopio ottico Nikon SMZ 1500, con obiettivo 1X WD 70 Nikon, ad ingrandimento 10x in campo chiaro.

Le immagini ottenute sono state analizzate mediante il software *ImageJ 1.40g* (NIH <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>) seguendo le indicazioni di *De Vico et al., (2005)*.

In breve, le immagini sono state binarizzate dopo “*tresholding*” della sola porzione citoplasmatica ovocitaria, ed infine dalle maschere ottenute sono state estratte le “*outlines*”.

L’Analisi Frattale è stata effettuata tramite il metodo “*box-counting*”, utilizzando l’apposita plug-in che viene fornita nella versione base *Image J 1.40g*.

Il calcolo della FD viene effettuato automaticamente dal programma dopo aver indicato il numero di griglie (**N=64**) da sovrapporre all’immagine.

Il Software non calcola l’intervallo frattale dell’oggetto, ma solo la Dimensione Frattale sull’intero intervallo di griglie.

I dati raccolti nelle diverse categorie di ovociti considerate, sono stati valutati mediante ANOVA realizzata con il software *GraphPad InStat3 for Window*.

I risultati sono esposti nelle tabelle 1-2-3-4.

RISULTATI

I risultati ottenuti sono stati sintetizzati nelle seguenti tabelle:

Tabella 1 - Bufalo ANOVA FD Maschera

Title	BUFALI		
	Group A	Group B	Group C
Col. title	FD 64 A	FD 64 B	FD 64 C
Mean	1.6592904762	1.7200842105	1.7212217391
Standard deviation (SD)	0.09962	0.07424	0.05449
Sample size (N)	21	19	23
Std. error of mean(SEM)	0.02174	0.01703	0.01136
Lower 95% conf. limit	1.614	1.684	1.698
Upper 95% conf. limit	1.705	1.756	1.745
Minimum	1.449	1.527	1.612
Median (50th percentile)	1.665	1.721	1.723
Maximum	1.840	1.869	1.835
Normality test KS	0.1205	0.1350	0.1540
Normality test P value	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test?	Yes	Yes	Yes

L' ANOVA della FD Maschera per $P = 0.0291$ è considerata significativa con un intervallo di confidenza del 95%.

Tabella 2 - Bufalo ANOVA FD Outline

Title	BUFALI		
	Group A	Group B	Group C
Col. title	OUT 64 A	OUT 64 B	OUT 64 C
Mean	1.0940047619	1.0892	1.059273913
Standard deviation (SD)	0.05088	0.04255	0.03938
Sample size (N)	21	19	23
Std. error of mean(SEM)	0.01110	0.009762	0.008211
Lower 95% conf. limit	1.071	1.069	1.042
Upper 95% conf. limit	1.117	1.110	1.076
Minimum	1.018	1.035	1.019
Median (50th percentile)	1.086	1.077	1.042
Maximum	1.171	1.165	1.156
Normality test KS	0.1630	0.1382	0.2841
Normality test P value	>0.10	>0.10	<0.0001
Passed normality test?	Yes	Yes	No

L' ANOVA della FD Outline per $P = 0.0244$ è considerata significativa con un intervallo di confidenza del 95% .

Tabella 3 – Bovino ANOVA FD Maschera

Title	BOVINI FD		
	Group A	Group B	Group C
Col. title	FD 64 A	FD 64 B	FD 64 C
Mean	1.7196842105	1.73489375	1.7249083333
Standard deviation (SD)	0.05035	0.05208	0.06552
Sample size (N)	19	16	12
Std. error of mean(SEM)	0.01155	0.01302	0.01891
Lower 95% conf. limit	1.695	1.707	1.683
Upper 95% conf. limit	1.744	1.763	1.767
Minimum	1.654	1.644	1.570
Median (50th percentile)	1.710	1.734	1.731
Maximum	1.814	1.822	1.841
Normality test KS	0.1449	0.09791	0.1680
Normality test P value	>0.10	>0.10	>0.10
Passed normality test?	Yes	Yes	Yes

L' ANOVA della FD Maschera per $P = 0.7169$ è considerata non significativa con un intervallo di confidenza del 95%.

Tabella 4 – Bovino ANOVA FD Outline

Title	Bovini		
	Group A	Group B	Group C
Col. title	OUT 64 A	OUT 64 B	OUT 64 C
Mean	1.1844157895	1.1064875	1.087125
Standard deviation (SD)	0.1723	0.05001	0.03541
Sample size (N)	19	16	12
Std. error of mean(SEM)	0.03952	0.01250	0.01022
Lower 95% conf. limit	1.101	1.080	1.065
Upper 95% conf. limit	1.267	1.133	1.110
Minimum	1.044	1.039	1.031
Median (50th percentile)	1.158	1.109	1.078
Maximum	1.701	1.181	1.142
Normality test KS	0.4001	0.2204	0.1752
Normality test P value	<0.0001	0,0365	>0.10
Passed normality test?	No	No	Yes

L' ANOVA della FD Outline per $P = 0.0479$ è considerata significativa con un intervallo di confidenza del 95% .

CONCLUSIONI

Nella maggior parte delle specie la qualità degli ovociti, rappresenta il principale fattore che influenza l'efficienza della produzione embrionale in vitro (IVEP), nel bufalo gioca un ruolo ancora più importante, riducendo ulteriormente la disponibilità degli ovociti adatti all'IVEP (Neglia *et al.*, 2003).

In questa specie infatti la percentuale di recupero di complessi cumulo-oocita (COC) che si ottiene rispetto, ad esempio, alla specie bovina, è più bassa. Mediante l'aspirazione follicolare controllata su ovaie da macello, di follicoli di diametro compreso tra 2 e 8 mm, la media di ovociti recuperati da ciascun ovaio varia tra 0.7 (Totey *et al.*, 1992) e 1.7 (Das *et al.*, 1996) e l'alta incidenza di follicoli atresici riduce la percentuale di ovociti di buona qualità che oscilla tra 0.4 (Totey *et al.*, 1992), 0.9 (Das *et al.*, 1996), 1.76 (Samad *et al.*, 1998) e 2.4 (Gasparrini *et al.*, 2000).

E' stato, inoltre, riferito che la stagione influenza il recupero medio di ovociti, che risulta ridotto in estate (Misra, 2005).

La bassa percentuale di recupero di ovociti, rappresenta un grosso limite rispetto alla specie bovina in cui si recuperano mediamente da ciascun ovaio 10 ovociti di buona qualità (*Gordon, 1994*).

Queste differenze originano dalle diverse caratteristiche fisiologiche della bufala: i follicoli primordiali variano tra 10.000 e 19.000 (*Samad et al., 1979*) rispetto ai 150.000 della bovina (*Erickson, 1966*), ed anche i follicoli antrali sono in numero ridotto durante tutti gli stadi del ciclo estrale (*Kumar et al., 1997*).

Ancora, normalmente, la bufala è macellata quando la sua produttività e la sua fertilità sono compromesse o quando è alla fine della sua carriera produttiva e la sua riserva follicolare è ormai ridotta. Infatti, a differenza del bovino, la carriera produttiva della bufala oltrepassa generalmente i 12 anni.

È stato dimostrato anche che la presenza del corpo luteo riduce considerevolmente la percentuale di recupero (*Nandi et al., 2000*) poiché le cellule luteiniche occupano gran parte dell'ovaio ed impediscono lo sviluppo follicolare.

Per aumentare il numero di ovociti ottenibile da ciascun ovaio, sono stati illustrati diversi metodi di recupero quali la dissezione

follicolare, lo “slicing” (tagliuzzamento) e la puntura follicolare (Boni 1994a; Boni et al., 1994b).

A differenza di quanto si è osservato nel bovino (Katska, 1984), nella bufala la tecnica della dissezione follicolare non ha dato un significativo aumento della percentuale di recupero.

Nella pratica laboratoristica si ricorre dunque, quasi sempre all’aspirazione dei follicoli con un ago collegato ad una pompa da vuoto, al fine di mantenere costante la pressione e di evitare un eccessivo dispendio di tempo che potrebbe compromettere la vitalità degli ovociti.

La fase di recupero è chiaramente seguita dalla selezione degli ovociti di buona qualità.

L’aspetto morfologico dell’ovocita riflette, con una certa attendibilità, la competenza allo sviluppo dello stesso (Neglia et al. 2003).

Nel bovino è stata stabilita una chiara correlazione tra la morfologia dell’ovocita e la sua competenza, intesa come capacità di essere fecondato e di svilupparsi fino allo stadio di blastocisti (Hazalegean, 1995; Wurth e Kruip 1992).

Chauhan et al., (1998) hanno, quindi, stabilito una classificazione basata sulla valutazione morfologica degli ovociti bufalini che ne riflette la competenza allo sviluppo.

Diversi Autori hanno dimostrato, in differenti prove sperimentali che esiste, sia per il bovino che per il bufalo, una correlazione tra l'aspetto morfologico degli ovociti e la competenza allo sviluppo, indicata dal progressivo decremento dell'efficienza dell'IVEP che si registra passando dagli ovociti di *GRADO A*, a quelli di *GRADO B*, ed in fine al di *GRADO C* (*Blondin et al.,1997; Boni et al., 2001; Chauhan et al., 1998; Hazalegan, 1995; Neglia et al., 2003;*).

Idealmente solo gli ovociti di *GRADO A* e *B* sono utilizzabili per l'IVEP, ma talvolta allo scopo di ottenere il maggior numero di embrioni si utilizzano anche gli ovociti di *GRADO C* (*Neglia et al 2003*).

Sulla scorta di quanto esposto da *De Vico et al., (2005)* abbiamo applicato, una nuova strategia morfometrica che utilizza la segmentazione dei livelli di grigio "*thresholding*" e la metodologia dei frattali per verificare il presupposto teorico che la morfologia del citoplasma degli ovociti di bufalo e bovino posseda un

comportamento frattale *auto-similare*, e valutare la dimensione frattale (*FD*) del citoplasma in diversi gruppi di ovociti di bovino e bufalo al fine di fornire un metodo obbiettivo e riproducibile per la descrizione morfologica e la classificazione delle diverse categorie note di ovociti in queste specie.

Nella Nostra esperienza abbiamo potuto osservare:

- Il valore *FD* delle *outlines* è quello che meglio si è correlato al *grading* ovocitario.
- Il valore della dimensione frattale (alle *outlines*) relative al profilo citoplasmatico degli ovociti stimati aumenta progressivamente passando dagli ovociti di *GRADO C* a quello di *GRADO B* e infine a quelli di *GRADO A*.
- La *FD* valutata sull' *outlines* è un parametro oggettivo che ci consente di individuare ovociti con una maggiore capacità maturativa e potenziale di sviluppo embrionale.
- Dall'esame dei limiti di confidenza al 95% delle distribuzione dei valore delle tre categorie considerate possiamo ipotizzare che gli ovociti che presentano un valore di *FD* >1.14 potrebbero

considerarsi un sottogruppo con una maggiore potenzialità di sviluppo embrionale.

In futuro andrebbe sperimentalmente valutata l'effettiva corrispondenza tra i singoli valori di FD degli ovociti individuali e le potenzialità di sviluppo embrionale in vitro degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

1. **Bartlett M. L.** - *Comparison of methods for measuring fractal dimension* - Austr. Phys. Eng. Sci. Med., 14, 146-152; **1991**.
2. **Bassingthwaite J.B., Liebovitch L., West B.J.** - *Fractal Physiology* - Oxford University Press, **1994**.
3. **Block A., von Bloh W., Schellhuber H.J.** - *Efficient box-counting determination of generalized fractal dimension* - Physical Review A Aug 15;42(4):1869-1874 ; **1990**.
4. **Boni R., Di Palo R., Barbieri V., Zicarelli L.** - *Ovum pick-up in deep anestrous buffaloes* - Proc IV World Buffalo Congress 3: 480-482;**1994a**.
5. **Boni R., Roviello S., Barbieri V., Zicarelli L.** - *In vitro embryo production in buffalo species* - Atti XLVIII Convegno Nazionale SISVET 1:307-312; **1994b**.
6. **Boni R., Cuomo A., Tosti E.** - *Developmental Potential in Bovine Oocytes Is Related to Cumulus-Oocyte Complex Grade, Calcium Current Activity, and Calcium Stores* - Biology Of Reproduction 66, 836-842; **2002**.
7. **Blondin P., Coenen K., Guilbault L.A., Sirard M.A.** - *In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation* - Theriogenology Apr 1;47(5):1061-75; **1997**.
8. **Caserta F., Stanley H. E., Eldred W. D., Daccord G., Hausman R. E., Nittmann J.** - *Physical mechanisms underlying neurite*

- outgrowth: a quantitative analysis of neuronal shape* - Phys. Rev.Lett., 64, 95 98; **1990**.
9. **Caserta F., Hausman R. E., Eldred W. D., Kimmel C., Stanley H.E.,** - *Effect of viscosity on neurite outgrowth and fractal dimension* - Neurosci. Lett., 136, 198 202, **1992**.
 10. **Caserta F., Eldred W.D., Fernandez E., Hausman R.E., Stanford L.R., Bulderev S.V., Schwarzer S., Stanley H.E.** - *Determination of fractal dimension of physiologically characterized neurons in two and three dimensions* - J Neurosci Methods. Feb; 56(2):133-44, **1995**.
 11. **Caldwell C. B., Stapleton S. J., Hodsworth D. W., Jong R. A., Weiser W. J., Cooke G., Yaffe M. J.** -*Characterization of mammographic parenchymal pattern by fractal dimension* - Phys.reed. Biol., 35, 235-247; **1990**.
 12. **Chauhan M.S., Singla S.K., Palta P., Manik R.S., Madan M.L.** - *In vitro maturation and fertilization, and subsequent development of buffalo (Bubalus bubalis) embryo: effects of oocytes quality and type of serum* - Reprod. Fertil. Dev. 10: 173-177; **1998**.
 13. **Cross S.S.** - *The application of fractal geometric analysis to microscopic Images* - Micron 25(1):101-13. Review **1994**.
 14. **Cross S.S.** - *Fractals in pathology* - J Pathol 182: 1-8, **1997**.
 15. **Cross S. S, and Cotton D. W. K.** - *The fractal dimension may be a useful morphometric discriminant in histopathology* - J. Path., 166,409-41; **1992**.

16. **Cross S. S., Rogers S., Silcocks, P. B., Cotton D. W. K.** - *Trabecular bone does not have a fractal structure on light microscopic examination* - J. Path., 170, 311-313, **1993**.
17. **Das G.K., Jain G.C., Solanki V.S., Tripathi V.N.**- *Efficacy of various collection methods for oocytes retrieval in buffalo* - Theriogenology 46: 1403-1411; **1996**.
18. **De Vico G., Peretti V., Losa G.A.** - *Fractal Organization Of Feline Oocyte Cytoplasm* - Eur JHistochem 498(2): 151-156, **2005**.
19. **Dell'Aquila M.E., Cho Y.S., La Calandra G.M., Traina V., Minoia P.** - *Fertilizability of in vitro matured equine oocytes after inytracytoplasmic sperm injection (ICSI) does not correlate to post-culture ooplasmic morphology* -Theriogenology 47(1):390-6, **1997**.
20. **Dioguardi N., Grizzi F., Bossi P. Roncalli M.** - *Fractal and spectral dimension analysis of liver fibrosis in needle biopsy specimens* - Anal Quant Cytol Histol 21: 262- 266, 1999.
21. **Dubuc B., Quiniou J.F., Roques-Carmes C., Tricot C., Zucker SW.** - *Evaluating the fractal dimension of profiles* - Physical Review A Feb 1;39(3):1500-1512, **1989**.
22. **Erikson B.H.**- *Development and senescence of post-natal bovine ovary* - J Anim Sci 25:800-805; **1966**.
23. **Falconer K.** - *Fractal Geometry - Mathematical Foundations and Applications* - John Wiley & Sons, II Edizione **2004**.
24. **Gasparrini B., Neglia G., Di Palo R., Campanile G., Zicarelli L.** - *Effect of cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development* - Theriogenology 54, 1537-1542; **2000**.

25. **Gordon I** - *Aspiration techniques: Old and new. In Laboratory Production of Cattle Embryos - Wallingford, UK: CAB International, 71-72; 1994.*
26. **Hazeleger N.L., Hill D.J., Stubbings R.B., Walton J.S.** - *Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro - Theriogenology 43:509-522, 1995.*
27. **Heymans O., Fissette J., Vico P., Blacher S., Masset D., Brouers F.** - *Is fractal geometry useful in medicine and biomedical sciences? - Med Hypotheses. Mar;54(3):360-6, 2000.*
28. **Huxlin K. R., Sefton A. J., Furby J. H.** - *The origin and development of retinal astrocytes in the mouse. - J. Neurocytol., 21, 53~544, 1992.*
29. **Katska L.** - *Comparison of two methods for recovery of ovarian oocytes from slaughter cattle - Anim. Reprod. Sci. 7: 461-463, 1984.*
30. **Keough K. M. W., Hyam P., Pink D. A., Quinn B.,** - *Cell surfaces and fractal dimensions - J. Microsc., 163, 95 99, 1991.*
31. **Kleinfeld D., Raccaia-Behling F., Blonder G. E.** - *Comment on Physical mechanisms underlying neurite outgrowth: a quantitative analysis of neuronal shape¹ - Phys. Rev. Lett., 65, 3064, 1990.*
32. **Kumar A., Solanki V.S., Jindal S.K., Tripathi V.N., Jain G.C.** - *Oocytes retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries - Anim Reprod Sci 47, 189-195; 1997.*

33. **Liebovitch L.S., Tibor T.**- *A fast algorithm to determine fractal dimensions by box counting - Physics Letters A 141(8/9), p.386-390,1989.*
34. **Lobachevsky N.** - *Nuovi principi della geometria - Universale Bollati Boringhieri, 1974.*
35. **Losa G.A.** - *Fractals in pathology: are they really useful? - Pathologica 87: 310- 317, 1995.*
36. **Losa G.A.** - *Fractal morphometry of cell complexity – Rivista di Biologia (Biology Forum) May-Aug; 95(2):239-58, 2002.*
37. **Losa G.A., Baumann G., Nonnenmacher T.F.** - *Fractal dimension of pericellular membranes in human lymphocytes and lymphoblastic leukemia cells - Pathol Res Pract 188: 680-686, 1992.*
38. **Losa G.A., Nonnenmacher T.F.** - *Self Similarity and fractal irregularity in pathologic tissues - Mod Pathol 9: 174-182, 1996.*
39. **Mandelbrot B.B.** - *How long is the coast of Britain? Statistical self-similarity and fractional dimension - Science 155: 636- 638, 1967.*
40. **Mandelbrot B.B.** - *Fractals: Form, Chance and Dimension - Freeman, San Francisco, 1977.*
41. **Mandelbrot B.B.** - *The fractal geometry of nature - Freeman, San Francisco, 1983.*
42. **Misra A.K.** - *Embryo transfer technology in buffaloes. Process and developments - In: National Seminar on Recent Advances in Conservation of Biodiversity and Augmentation of*

Reproduction and Production in Farm Animals, Sardarkrushinagar, India, March 6-7, 2005.

43. **Montague P. R. and Friedlander M. J.** - *Expression of an intrinsic growth strategy by mammalian retinal neurons* - Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A., 86, 7223-7227, 1989.
44. **Montague P. R. and Friedlander M. J.** - *Morphogenesis and territorial coverage by isolated mammalian retinal ganglion cells.*- J. Neurosci., 11, 1440-1457, 1991.
45. **Morigiwa K., Tauchi M., Fukuda Y.** - *Fractal analysis of ganglion cell dendritic branching patterns of the rat and cat retinae* - Neurosci. Res., S10, S131-St4, 1989.
46. **Mosekilde L.** - *Age-related changes in vertebral trabecular bone architecture assessed by a new method* - Bone, 9, 247-250, 1998.
47. **Muzzio P.C., Grizzi F.** - *Fractal geometry: possible applications to radiological imaging* - Radiol Med 98: 331-336, 1999.
48. **Nandi S., Chauhan M.S., Palta P.** - *Effect of a corpus luteum on the recovery and developmental potential of buffalo oocytes* - Vet. Rec 147: 580-581, 2000.
49. **Neale E. A., Bowers L. M., Smith T. G.,** - *Early dendrite development in spinal cord cell cultures: a quantitative study* - J. Neurosci. Res., 34, 54-66, 1993.
50. **Neglia G., Gasparrini B., Caracciolo di Brienza V., Di Palo R., Campanile G., Presicce G.A., Zicarelli L.** - *Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries*

or collected by transvaginal follicle aspiration - Theriogenology
59, 1123-1130; **2003**.

51. **Nonnenmacher T.F., Baumann G., Barth A., Losa G.A.** - *Digital image analysis of self-similar cell profiles - Int J Biomed Comput* 37: 131-138, **1994**.
52. **Porter R., Ghosh S., Lange G. D., Smith T. G.** - *A fractal analysis of pyramidal neurons in mammalian motor cortex - Neurosci. Lett.*, 130, 112-116, **1991**.
53. **Reichenbach, A., Siegel, A., Senitz, D. and Smith, T. G.,** - *A comparative fractal analysis of various mammalian astroglial cell types - Neuroimage*, 1, 69-77, **1992**.
54. **Ruttimann U. E., Webber R. L., Hazelrig J. B.** - *Fractal dimension from radiographs of peridental alveolar bone - Oral Surg.Oral Med. Oral Path.*, 74, 98-110, **1992**.
55. **Samad H.A., Nasser A.A.** - *A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries - Compendium 13 FAO/SIDA Int. Course Anim. Reprod.*, **1979**.
56. **Samad H.A., Khan I.Q., Rehman N.U., Ahmed N.** - *The recovery, in vitro maturation and fertilization of Nilli-Ravi buffalo follicular oocytes. Asian Aust -J Anim Sci* 11, 491-497; **1998**.
57. **Smith T. G., Marks W. B., Lange G. D., Sheriff W. H., Neale E.A.** - *A fractal analysis of cell images - J. neurosci. Meth.*, 27, 173-180, **1989**.

58. **Smith T. G., Behar T. N., Lange G. D., Marks W. B., Sheriff W.H.** - *A fractal analysis of cultured rat optic nerve glial growth and differentiation* - *Neuroscience*, 41, 159-166, **1991**.
59. **Takeda T., Ishikawa A., Ohtomo K., Kobayashi Y., Matsuoka T.** - *Fractal dimension of the dendritic tree of cerebellar Purkinje cell during onto- and phylogenetic development* - *Neurosci. Res.*, 13, 19-31, **1992**.
60. **Tomas J., Santafe M., Fenoll R., Mayayo E., Batlle J., Lanuza A., Piera V.** - *Pattern of arborization of the motor nerve terminals in the fast and slow mammalian muscles* - *Biol. Cell*, 74, 299-305, **1992**.
61. **Totey S.M., Singh G., Taneja M., Pawshe C.H., Talwar G.P.** - *In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (Bubalus Bubalis)* - *J. Reprod. Fertil.* 95: 597-607; **1992**.
62. **Weibel E.R.** - *Fractal geometry: a design principle for living organisms* - *Am J Physiol* 261(6 Pt 1): L361-369, **1991**.
63. **West G.B., Brown J.H., Enquist B.J.** - *The fourth dimension of life: fractal geometry and allometric scaling of organisms* - *Science* 284: 1677-9, **1999**.
64. **Wingate R. J. T., Fitzgibbon T., Thompson I. D.,** - *Lucifer yellow, retrograde tracers and fractal analysis characterize adult ferret retinal ganglion cells* - *J. comp. Neurol.*, 323, 449-474. **1992**.
65. **Wurth Y.A., Kruip ThA.M.** - *Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes.* - In: *Proceedings of the*

12th International Congress of Animal Reproduction (ICAR);
August 23- 27, 1992; The Hague, The Netherlands. 1:387-389
1992.