

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**



**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**PRODUZIONE E SANITÀ DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

**INDIRIZZO: SCIENZE DELL'ALLEVAMENTO ANIMALE**

**XXIV CICLO**

**FUNZIONALITA' DEL CORPO LUTEO E  
MORTALITA' EMBRIONALE NELLA  
BUFALA MEDITERRANEA ITALIANA  
(*BUBALUS BUBALIS*)**

**Tutor**

**Chiar.mo Prof. Luigi Zicarelli**

**Candidato**

**Dott. Michele Madonna**

**Coordinatore**

**Chiar.ma Prof.ssa Maria Luisa Cortesi**

**TRIENNIO 2008 – 2011**

**AI MIEI GENITORI, MIA SORELLA, MIA NIPOTE E MIA NONNA**

**AI MIEI AMICI**

**AI PROFF. ZICARELLI E CAMPANILE**

**MICHELE**

# INDICE

## PARTE GENERALE

<b>1. Introduzione</b>	Pag. 6
1.1 Stagionalità riproduttiva nella specie bufalina	Pag. 9
1.2 Anaestro	Pag. 23
1.3 Destagionalizzazione dei parti	Pag. 28
<b>2. Ciclo estrale e funzione ovarica</b>	Pag. 31
2.1 Sviluppo follicolare	Pag. 33
2.2 Risposta follicolare a ormoni esogeni: induzione dell'ovulazione	Pag. 41
2.3 Superstimolazione follicolare	Pag. 43
2.4 Corpo luteo	Pag. 45
2.5 Corpo luteo e sincronizzazione dell'estro	Pag. 50
2.6 Importanza dell'irrorazione del follicolo preovulatorio e del corpo luteo	Pag. 52
<b>3. Sviluppo e perdita embrionale</b>	Pag. 60
3.1 Sviluppo embrionale	Pag. 60
3.2 Mortalità embrionale e fetale	Pag. 62
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
<b>4. Scopo del lavoro</b>	Pag. 66

## **5. Esperimento 1: Vascolarizzazione del follicolo e del corpo luteo e mortalità embrionale tardiva nella specie bufalina**

5.1 Materiali e metodi	Pag. 67
5.2 Indagine ecografica	Pag. 70
5.3 Analisi statistica	Pag. 72
5.4 Risultati	Pag. 72
5.5 Discussione	Pag. 80

## **6. Esperimento 2: Influenza della stagione sulla funzionalità del corpo luteo e riflessi sull'efficienza dell'inseminazione strumentale nella specie bufalina**

6.1 Materiali e metodi	Pag. 83
6.2 Analisi statistica	Pag. 85
6.3 Risultati	Pag. 86
6.4 Discussione	Pag. 89

## **7. Esperimento 3: Effetto del trattamento tardivo con GnRH, hCG e progesterone sulla fertilità della bufala**

7.1 Materiali e metodi	Pag. 96
7.2 Analisi statistica	Pag. 99
7.3 Risultati	Pag. 99
7.4 Discussione	Pag. 103

## **8. Conclusioni**

Pag. 109

## **9. Referenze bibliografiche**

Pag. 113

# **PARTE GENERALE**

## **1. Introduzione**

L'ottimizzazione delle produzioni animali dipende dal ripristino rapido dell'attività riproduttiva subito dopo il parto e/o dall'anticipazione della pubertà nei soggetti destinati alla rimonta. Queste condizioni, infatti, contribuiscono a ridurre il periodo improduttivo. Inoltre, la diminuzione dell'età in cui si instaura la pubertà riduce l'intervallo generazionale e favorisce il miglioramento genetico. Diversi fattori, inoltre, influenzano l'attività riproduttiva, come le patologie, il management aziendale, le condizioni climatiche, la disponibilità di spazio e la nutrizione. Essi possono svolgere un ruolo diretto o indiretto, ma in ogni caso possono sempre modificare le caratteristiche riproduttive. Le reazioni di ogni singola specie ai fattori sopra menzionati non sempre sono evidenti, nelle specie fotoperiodiche l'ambiente e la stagione hanno una maggiore influenza, mentre la nutrizione gioca un ruolo molto importante nelle specie ad elevata specializzazione produttiva e, in special modo, nel ridurre il divario energetico all'inizio della lattazione. In ogni caso, i fattori sopra elencati possono interagire tra di loro e rafforzare gli effetti negativi che condizionano l'attività produttiva e riproduttiva delle specie in produzione zootecnica.

La bufala è una specie che vive nelle regioni comprese tra il 31° parallelo Nord ed il 2° parallelo Sud. Attualmente, la distribuzione della

popolazione bufalina copre le regioni climatiche che vanno dalle latitudini più basse (zona tropicale) alle medie latitudini (zona Nord). Questa origine geografica e la distribuzione suggeriscono logicamente che i bufali si siano adattati ai macro e microclimi caldi e umidi. La bufala è una specie sensibile al fotoperiodo. Come le pecore, le bufale sono da considerarsi specie a "giorno breve". Hanno calori tutto l'anno, ma tendono a rivelarsi più fertili quando le ore di luce diminuiscono. Secondo **Zicarelli [1995]**, questa caratteristica è dovuta alla loro origine tropicale. In realtà, esse provengono da zone a nord dell'equatore, dove la disponibilità di foraggio coincide con il periodo in cui aumentano le ore di buio. Pertanto, è stato supposto che siano stati selezionati gli animali che partoriscono nel periodo più adatto per la sopravvivenza della prole. Sembra che abbiano mantenuto questa caratteristica anche quando siano stati trasferiti in luoghi dove il foraggio è sempre (Italia) o meno (aree a Sud dell'Equatore come San Paolo, Br) disponibile [**Zicarelli, 1995**].

La riproduzione della bufala è caratterizzata da ritardo della pubertà, estro silente, lunga inattività ovarica postpartum e scarsa fertilità [**Singh, 1988; Madan, 1988; Singla et al., 1996**]. La maggior parte di questi problemi deriva dall'uso della tecnica di "destagionalizzazione dei parti" [**Zicarelli, 1997; Gasparrini, 2002**]. Infatti, se le bufale sono

allevate rispettando la loro epoca riproduttiva presentano un periodo di interparto inferiore a 400 giorni e un tasso di infertilità inferiore al 12%

**[Zicarelli, 1994].**

Immediatamente dopo il parto, le bufale mostrano diverse modificazioni fisiologiche fondamentali per sostenere la nuova gravidanza. Il primo passo è la ripresa del ciclo ovarico. Questo è bloccato durante la gravidanza dal progesterone, che evita altre ovulazioni e mantiene ipotonico l'utero.

## 1.1 Stagionalità riproduttiva nella specie bufalina

Gli animali selvatici sono generalmente stagionali, anche se questa caratteristica è andata gradualmente diminuendo con l'addomesticamento. Tuttavia, è ancora presente in alcune sottospecie bovine (*Bos taurus taurus*), allevate liberamente come la Podolica, la Sarda, la Maremmana, il bovino Highland e lo zebù (*Bos taurus indicus*). Per quanto riguarda il cavallo, la pecora, la capra e la bufala stessa, la stagionalità riproduttiva è stata solo parzialmente influenzata dalla domesticazione e dal modificarsi dell'area di allevamento. Il fatto che la selezione e il miglioramento dell'apporto alimentare hanno reso indipendenti le vacche da latte dalla rigorosa stagionalità riproduttiva, non significa che questo è o sarà altrettanto facilmente ottenibile in altre specie.

Il luogo di origine e la durata della gestazione hanno influenzato la stagionalità riproduttiva. Infatti, la necessità naturale di far coincidere parto e svezzamento con i periodi stagionali più adatti al fine di soddisfare la riproduzione e le esigenze nutritive della prole attraverso un periodo in cui gli agenti eziologici (infettivi e parassitari) sono meno aggressivi e/o presenti [Zicarelli et al., 1988] rappresenta una delle cause di questo processo di "adattamento" [Maeda et Lincoln, 1990]. Quei soggetti adattati alle condizioni più favorevoli, hanno portato ad

una selezione naturale di una stagionalità riproduttiva più idonea verso la sopravvivenza della specie. Le caratteristiche riproduttive sono state probabilmente determinate da stimoli recettivi del sistema nervoso centrale (SNC) durante la gestazione o i primi giorni di vita. Il parto a primavera (Marzo-Maggio), che garantisce al vitello la disponibilità di buon foraggio nelle zone temperate a nord dell'equatore, si verifica quando la riproduzione avviene in autunno (Settembre-Novembre) nel caso di cinque mesi di gestazione (pecore e capre) o la primavera precedente, 11 e 12 mesi (cavalli e asini). Pertanto, lo stesso periodo in cui si verifica il parto è condizionato dalla sensibilità del sistema neuroendocrino, per la riattivazione del ciclo riproduttivo, mentre gli animali a giorno breve (fotoperiodo negativo) o a giorno lungo (fotoperiodo positivo) sono in relazione con la durata della gestazione. In alcune zone tropicali (a nord dell'equatore), la disponibilità di foraggio si trova di solito dopo la stagione delle piogge, che inizia usualmente in Agosto-Dicembre [Vale et al., 1996]. Nel bufalo, la cui gravidanza dura circa 10 mesi, la sensibilità alla luce e la stagione riproduttiva coincide nell'emisfero settentrionale al periodo compreso tra Settembre e Gennaio. Tuttavia, con il passare delle generazioni, lo stimolo luminoso è stato il fenomeno che è prevalso sulla condizione riproduttiva delle specie fotosensibili, anche dopo lo spostamento in altri luoghi.

All'equatore, la sensibilità alla luce non influenza l'attività riproduttiva a causa del costante rapporto luce/buio durante l'anno. In tal caso, l'ottimizzazione delle esigenze nutrizionali di specie animali come bufala, equino e ovino prevalgono sullo stimolo luminoso [Vale et al., 1996].

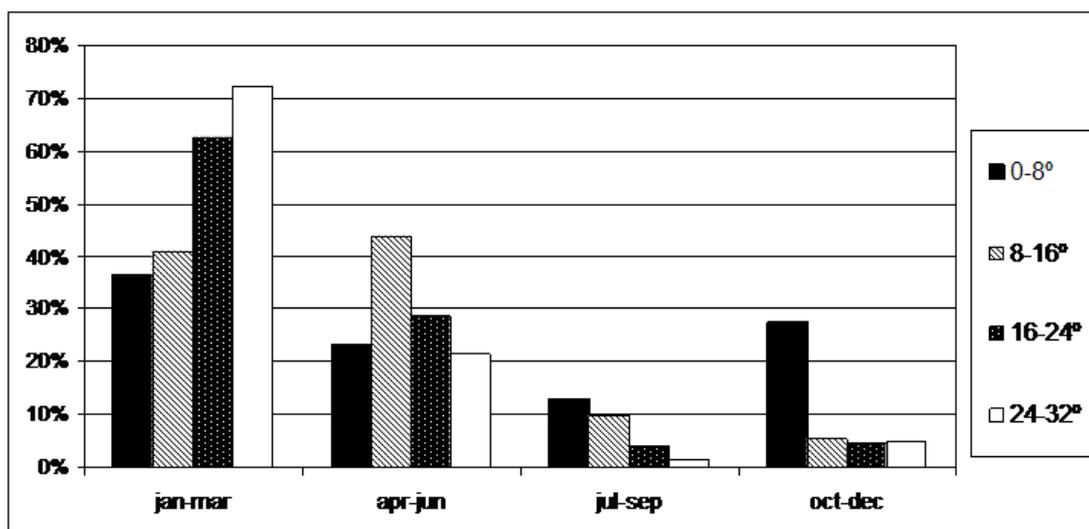
Così, si può prevedere che ci sia una tendenza alla stagionalità, mano a mano che il bufalo si allontana dall'equatore. A qualunque tipo di fotoperiodo un animale mostra la sensibilità alla lunghezza e alla densità della fonte di luce, fattori questi che influenzano l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade, tramite un percorso neurale multi-step che coinvolge la retina, il nucleo soprachiasmatico (SCN), il ganglio cervicale superiore (SCG) e, infine, la ghiandola pineale. La luce regola il ritmo della melatonina in due modi: in primo luogo grazie alla sincronizzazione di un pacemaker circadiano nel nucleo soprachiasmatico (SCN) che controlla l'attività della ghiandola pineale e in secondo luogo da una inibizione acuta della produzione di melatonina. La durata della secrezione di melatonina fornisce quindi un indice endocrino della lunghezza della notte e quindi della lunghezza del giorno [Lincoln et al., 2005].

Il ciclo del fotoperiodo stagionale o annuale sono regolati dalle azioni della melatonina o dai suoi tessuti bersaglio. I segnali di lunga durata

della melatonina promuovono una fisiologia invernale ed i segnali di breve durata promuovono una fisiologia estiva. Questo fenomeno è stato dimostrato da alcuni studi condotti in pecore e criceti pinealectomizzati, in cui la durata della somministrazione di melatonina esogena con pompe per infusioni ha indotto l'attivazione dei due tipi di fisiologia stagionale [**Bartness et al., 1993**]. E' probabile che gli effetti del fotoperiodo / melatonina sui diversi aspetti della fisiologia stagionale (ad esempio la riproduzione, il peso corporeo, ecc) siano mediati da recettori della melatonina espressi in una gamma di diverse cellule bersaglio neurali, pituitarie, e probabilmente periferiche [**Lincoln et al., 2003**]. Alcuni studi effettuati su ovini hanno dimostrato che il SCN contiene un orologio biologico interno che regola i ritmi circadiani endogeni [**Lincoln, 1979**]. Gli stimoli elaborati lì, sono trasmessi per mezzo della SCG alla ghiandola pineale, che funziona come un trasduttore convertente le informazioni neuronali derivanti dall'alternanza del rapporto luce/buio. Nella ghiandola pineale, l'informazione neuronale stimola i ritmi della secrezione di melatonina, che regola i complessi meccanismi dell'attività ipotalamico-ipofisaria e, quindi, la funzione delle gonadi [**Lincoln, 1992**]. La somministrazione di melatonina diminuisce l'attività della tirosina idrossilasi e aumenta la secrezione di LH; questa modulazione è indipendente dall'azione dell'estradiolo.

E' interessante notare che l'inibizione dell'attività dell'enzima tirosina idrossilasi, attraverso una iniezione sistemica di un antagonista della dopamina (pimozide) durante la stagione di anaestro, evoca un temporaneo aumento della secrezione di LH. E' noto anche che i livelli di PRL sono alti durante l'anaestro. In altre specie alti livelli di PRL diminuiscono in seguito alla somministrazione di dopamina. Così, la diminuzione di PRL è fondamentale per la ripresa o la regolarizzazione del ciclo ovarico in molte specie domestiche come ovini, roditori, suini così come negli esseri umani. Questo porta ad una ipotesi che il ruolo della dopamina varia tra le specie animali e probabilmente con la loro sensibilità al giorno breve/lungo. Il ruolo preciso svolto da PRL e quindi dalla dopamina, la cui azione diminuisce la secrezione di LH nelle pecore, è difficile da definire. Per esempio, è stato osservato che alti livelli di prolattina e bassi livelli di ormoni tiroidei (Triiodotironina e Tiroxina) nei mesi della primavera / estate non interferiscono con il ciclo estrale o con il concepimento della manza bufalina [Avallone et al., 1994]. D' altra parte, autori indiani [Sheth et al., 1978] hanno affermato che elevati livelli di PRL sono presenti in bufali in anaestro e che diminuiscono in seguito alla somministrazione di bromocriptina [Madan, 1988]. Altri autori in diversi studi [Avallone et al., 1994; Campanile et al., 1994; Borady et al., 1985] hanno trovato che alti

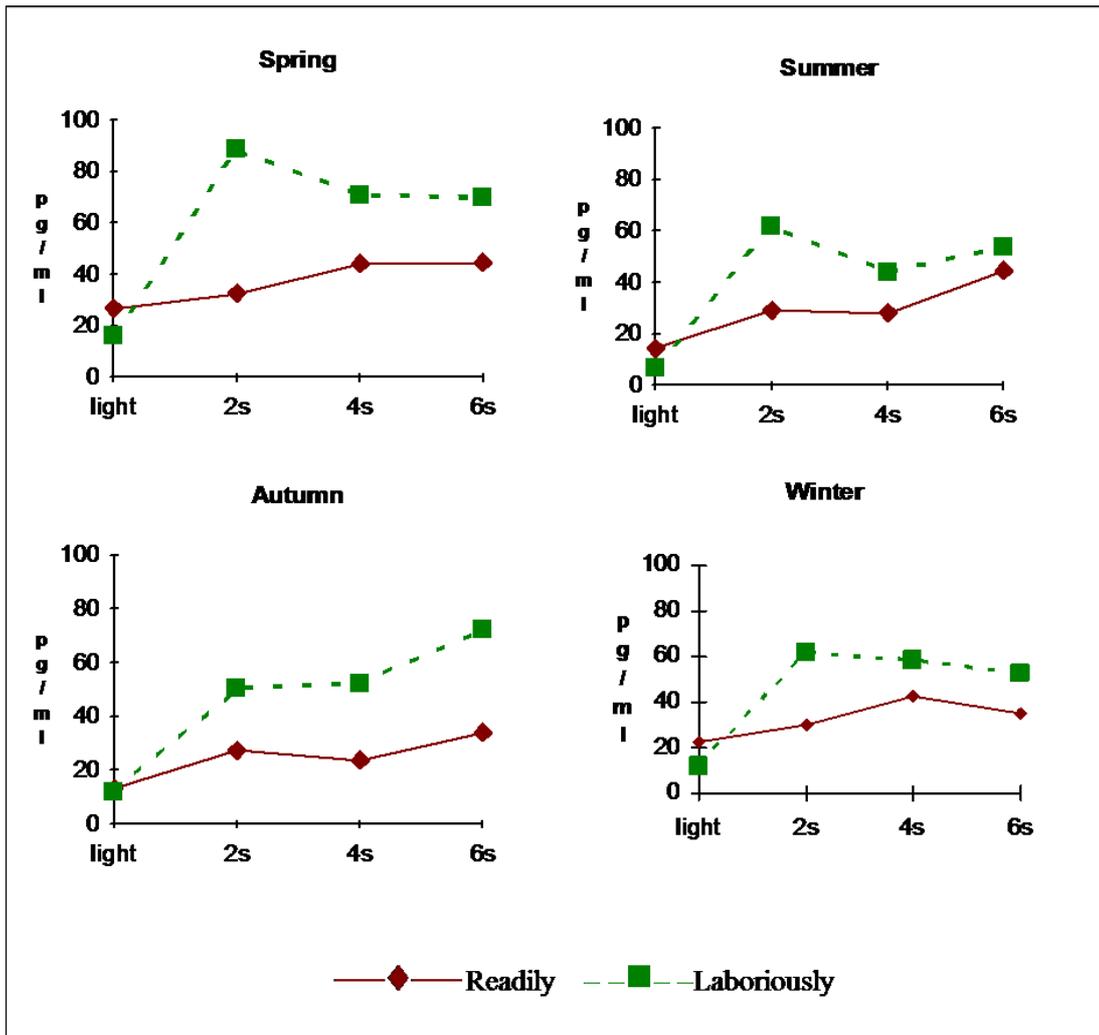
livelli di PRL seguivano una diminuzione degli ormoni tiroidei. Bassi livelli di questi ormoni sono fisiologici in primavera ed estate ed evocano un aumento del TRH che notoriamente aumenta i livelli di PRL. Quindi, la luce sopprime e l'oscurità favorisce la secrezione di melatonina. Nella specie bufalina la melatonina è il segnale endocrino che segna l'alternanza luce-buio del giorno [Morgan et Williams, 1989]. I valori plasmatici di questo ormone si mantengono a livelli elevati durante le ore di buio e, in particolare, in autunno e in inverno rispetto alla primavera e all'estate (**Figura 1**).



**Figura 1.** Livelli plasmatici di melatonina in bufale rilevati alla luce del giorno (due ore prima del tramonto) e due (2s), 4 (4s), 6 (6s) ore dopo il tramonto, durante le quattro stagioni.

Inoltre, questo quadro appare differente quando le misurazioni dei livelli plasmatici di melatonina sono fatte in animali allevati in aziende

zootecniche dove la destagionalizzazione è stata utilizzata per molti anni con successo (più dell'80% degli animali partorisce nei primi sette mesi dell'anno) oppure quando vengono presi in esame animali allevati in aziende dove questa tecnica induce una significativa diminuzione dell'efficienza riproduttiva. Il quadro circadiano della melatonina è differente negli animali che generalmente partoriscono durante la stagione primaverile o autunnale. Infatti, durante l'inverno e specialmente in primavera, due ore dopo il tramonto, le bufale più sensibili allo stimolo del fotoperiodo, mostrano valori più alti di melatonina (**Figura 2**) rispetto agli animali che sono meno sensibili all'effetto del fotoperiodo [**Di Palo et al., 1993; Parmeggiani et Di Palo, 1994**].



**Figura 2.** Lunghezza delle ore di luce e percentuale dei parti per mese in differenti nazioni.

Il management aziendale e l'area di allevamento non influenzano i livelli di melatonina plasmatici [Di Palo et al., 1997]. I livelli plasmatici di melatonina, dosati su campioni prelevati due ore dopo il tramonto, mostrano un valore ripetibile di 0,733 [Di Palo et al., 1993]. L'alta ripetibilità rilevata nella specie bufalina, permette di poter utilizzare i

livelli plasmatici di melatonina come un mezzo in grado di rilevare una sensibilità dell'animale agli effetti stagionali [Zicarelli, 1994]. Se l'ereditarietà di questo individuo risulta essere elevata, tale fenomeno sarà compreso nei programmi di selezione genetica di questa specie. Ciò premesso, la determinazione naturale di questa caratteristica riveste una grande importanza economica, specialmente in Italia e in altre zone in cui il sistema di produzione della bufala è legato alla stagione. Inoltre, anche per altre regioni geografiche questa procedura può essere vantaggiosa per l'allevamento di bufale non sensibili alla stagione.

Inoltre, si può sottolineare che le bufale che partoriscono durante la primavera e che mostrano una secrezione di melatonina più bassa dopo il tramonto sono quelle che riescono ad adattarsi meglio rispetto alla tecnica di destagionalizzazione [Di Palo et al., 1993; Parmeggiani et Di Palo, 1994]. Le manze sono meno sensibili alla stagionalità rispetto alle adulte e mostrano livelli plasmatici di melatonina più bassi dopo il tramonto [Borghese et al., 1995].

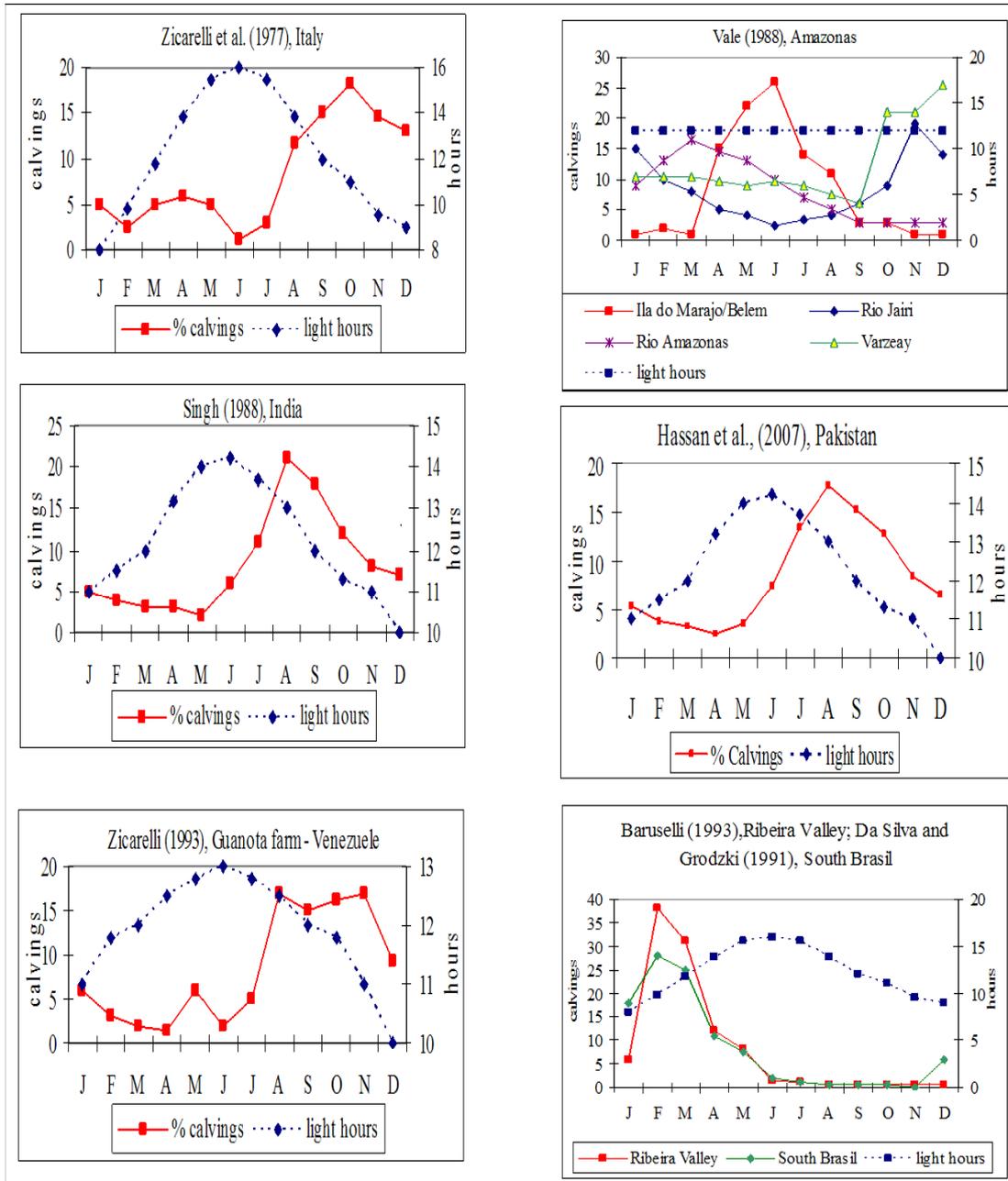
La lunghezza delle ore di luce influenza il parto durante tutto l'anno nella specie bufalina. In condizioni naturali, l'attività riproduttiva aumenta durante il periodo in cui le ore di luce diminuiscono. Infatti, in Italia (**Figura 2**), nelle aziende bufaline in cui la tecnica della destagionalizzazione non viene utilizzata, la ripresa dell'attività

riproduttiva inizia da Settembre (periodo di decremento delle ore di luce) fino a Gennaio (periodo di incremento delle ore di luce) [**Zicarelli et al., 1997**]. Questo fenomeno è stato osservato sia quando le mandrie sono tenute al pascolo che in stalla. Alle nostre latitudini, il pascolo è abbastanza povero da Settembre fino a Febbraio, anche se un buon pascolo può essere trovato occasionalmente dopo una fine estate piovosa. Generalmente, dopo la metà di giugno, il pascolo è povero e le condizioni nutrizionali delle mandrie, in autunno all'inizio della lattazione e ripresa del ciclo ovarico, sono generalmente scarse. D'altra parte nelle aree tropicali, durante gli stessi mesi, generalmente il foraggio è abbondante [**Shah, 1990**].

La sensibilità al fotoperiodo negativo si è rilevata anche in aziende in cui viene somministrata, durante tutto l'anno, una dieta equilibrata e costante che soddisfa i fabbisogni nutrizionali del bufalo [**Zicarelli et al., 1988a; Zicarelli, 1992; 1994**]. Questo tipo di stagionalità, in cui gli eventi riproduttivi non sono sincronizzati con la disponibilità di foraggio, indica che le bufale allevate in Italia non sono autoctone. Infatti, in queste aree le bufale partoriscono in periodi in cui c'è bassa disponibilità di foraggio e temperatura bassa. Queste condizioni si scontrano con i fabbisogni di sopravvivenza del vitello, poiché lo svezzamento avviene tra il tardo inverno e inizio primavera, ed aumenta la sensibilità alla *Pasteurella*

*bubaliseptica*, agente eziologico di una malattia chiamata “barbone” che colpisce seriamente i vitelli bufalini. Una stagionalità simile (**Figura 2**) a quella trovata in Italia [**Zicarelli et al., 1977**] e nelle aree tropicali asiatiche (India e Pakistan) è stata rinvenuta anche in Venezuela [**Zicarelli, 1994**], Egitto, Argentina e Brasile [**Baruselli et al., 2001**].

Nella zona equatoriale del Brasile il periodo dei parti [**Vale et al., 1996**] è, comunque, concentrato in differenti mesi (**Figura 2**) e segue la stagione delle grandi piogge (Novembre-Aprile), che coincide con una buona disponibilità di foraggio. In particolare, la stagionalità è influenzata dalla latitudine (**Figura 2**) ed è accentuata procedendo da Nord (0-8 gradi) verso Sud (24-32 gradi) (**Figura 3**). Queste osservazioni sono state confermate da recenti studi effettuati in Brasile [**Lamberson et al., 2007; Nascimento et al., 2007**], poiché la stagionalità delle bufale allevate nel Sud e Sud-Est del Brasile è molto più accentuata rispetto a quella di animali allevati a Goias, che è posizionata nel Nord del Brasile.



**Figura 3.** Distribuzione trimestrale dei parti bufalini a differenti latitudini in Brasile [Baruselli et al., 2001].

Nonostante le modifiche apportate a molte condizioni di management, il fotoperiodo non è stato condizionato durante gli ultimi 30 anni [Zicarelli et al., 1977], ad esclusione di quelle realtà aziendali che applicano la tecnica della destagionalizzazione per lunghi periodi. In questo caso, gli animali sono meno sensibili alla lunghezza del giorno. Questo è un'ulteriore conferma che il carattere "fotoperiodo" dovrebbe essere considerato nei programmi di selezione genetica di questa specie. Da queste osservazioni, si può affermare che:

- a) La bufala presenta una più grande tendenza a concentrare l'attività riproduttiva nei mesi in cui le ore di luce diminuiscono;
- b) nelle zone in cui il rapporto luce/buio è costante non esiste una tendenza alla stagionalità.

Sembra, in pratica, che l'inizio dell'attività riproduttiva richieda particolari condizioni ambientali (disponibilità di buoni foraggi) o comportamento sessuale di gruppo o corale.

Quest'ultimo aspetto, che è stato notato nelle aree amazzoniche, è presente anche in Italia, dove fasi di intensa attività riproduttiva (indipendentemente dalla stagione) si alternano a periodi di stasi sessuale. Questo particolare comportamento determina una concentrazione di nascite. Generalmente, ciò è dovuto a differenti

condizioni ambientali. Infatti, si sa che il bufalo è estremamente sensibile alle variazioni climatiche [**Campanile et al., 1988; Roy et al., 1968; Vale et Ohashi, 1994; Singh et Desai, 1979**]. Ad ogni modo, anche se è presente lo stesso macroclima, altri fattori possono influenzare l'attività riproduttiva negli allevamenti bufalini, ad esempio il ritmo dell'accrescimento, il management, la nutrizione, le pratiche igieniche e veterinarie, ecc.

Infine, è necessario prendere atto che la bufala non può essere considerata una specie con “*lactiferus habitus*” e quindi un “*catabolicus habitus*”. Infatti, la ridotta produzione lattea e, probabilmente, il suo metabolismo lipidico, la cui abilità di conservazione aiuta a prepararsi per i periodi di scarsa disponibilità di foraggio (tipico di animali che originano da zone a clima eccessivamente freddo o caldo), evita che la bufala presenti caratteristiche simili alle razze bovine ad elevata produzione lattea che usano le loro riserve per compensare l'energia e la deficienza di proteine durante le prime fasi della lattazione.

## 1.2 Anaestro

La stagionalità della bufala è caratterizzata dalla concentrazione dei parti in pochi mesi (5-7) durante l'anno. Comunque, quando il parto avviene in periodi differenti da quelli fisiologici, si osserva una più tarda ripresa dell'attività ovarica e del concepimento. Ciò porta ad un periodo di anaestro di lunghezza variabile e ad una ritardata ripresa dell'attività ovarica. Nel bovino il fenomeno dell'anaestro è spesso attribuito a fattori nutrizionali. Nel bufalo, comunque, la nutrizione è solo una delle cause; è indispensabile considerare anche altri fattori, come la sensibilità al fotoperiodo, l'ambiente e le endometriti, che giocano un ruolo principale nella riduzione della fertilità e nell'incremento del fenomeno dell'aciclia. In questo caso la riattivazione dell'attività ovarica avviene quando le ore di luce decrescono.

Rispetto al bovino, la bufala mostra un numero ridotto (2 vs 3-4) di onde follicolari [Borady et al., 1985], di follicoli antrali [Roy et al., 1968] e follicoli non atresici, peso ovarico (4 grammi vs 8,5 grammi) e volume (lunghezza media di 2,5 cm vs 3,7 cm). Questa differenza si osserva alla nascita, quando la vitella bufalina mostra 1/5 di oociti rispetto ad una vitella bovina della stessa età [Roy et al., 1968]. Questi fattori causano una riduzione del numero di cicli estrali dopo il parto. Se il

concepimento non avviene, si verifica il fenomeno dell'anaestro. Nella specie bufalina è possibile distinguere un "anaestro temporaneo" (durata <150 giorni) e un "anaestro profondo" (durata >150 giorni). L'anaestro dipende da una diminuzione dell'attività ipotalamo-ipofisi che influenza l'attività ovarica [**Kaker et al., 1980**]. Infatti, una pulsatilità più bassa si manifesta dopo un ciclo estrale evidente in quei soggetti che divengono aciclici e che non concepiscono [**Radzan et al., 1981; Zicarelli et al., 1997**]. Le bufale acicliche mostrano bassi livelli di ormone follicolo stimolante (FSH), progesterone (P4) [**Esposito et al., 1992; Radzan et al., 1981; Sheth et al., 1978; Vale et Ohashi , 1994; Zicarelli et al., 1988a; 1997; Zicarelli, 1992**] e 17- $\beta$ -estradiolo (E2) [**Sheth et al., 1978**]. Inoltre, sono stati rilevati alti livelli di prolattina (PRL), [**Sheth et al., 1978**] e bassi livelli di ormone tiroideo [**Borady et al., 1985; Karsch et al., 1995**] durante i mesi primaverili quando l'incidenza dei soggetti aciclici è più alta. L'interruzione dell'attività ciclica è solitamente preceduta da un estro normale, seguito poi da una secrezione luteinica inadeguata. Questo fenomeno è stato rilevato dopo l'inizio della stagione dell'anaestro nella pecora, dopo la prima ovulazione postpartum nelle bovine e durante la fase prepuberale delle due specie. Questi disordini riproduttivi sono riconducibili a due cause

principali: una fase luteinica breve e una fase luteinica lunga con bassa produzione di progesterone [**Garverick et al., 1992**].

Le cause dell'anaestro sono differenti se consideriamo la specie bufalina allevata in Italia o in altre nazioni. In Italia, le richieste di mercato causano modificazioni della stagione dei parti, mentre nei paesi in via di sviluppo il periodo degli accoppiamenti resta invariato. In quest'ultimo caso, le cause dell'anaestro sono attribuibili piuttosto a fattori nutrizionali.

In Italia, il blocco della ripresa ovarica, nella specie bufalina, dopo un periodo variabile è particolarmente evidente quando si applica la tecnica di destagionalizzazione dei parti e coinvolge tutte le bufale che partoriscono nei primi due mesi dell'anno o nei primi cinque mesi in zone a clima freddo.

Nel Sud Italia, è stato registrato che a 70 giorni dal parto il 50,3 % delle primipare e il 24,0 % delle pluripare erano acicliche. Il periodo parto-concepimento è più breve nei soggetti che partoriscono dopo Marzo poiché non passano più di 40 giorni tra il primo ciclo fertile (60 giorni dopo il parto) e l'inizio del periodo a giorno breve. Le bufale che partoriscono nei primi due mesi dell'anno, o nei primi cinque mesi nelle zone fredde, vanno incontro ad anaestro profondo se non si ingravidano

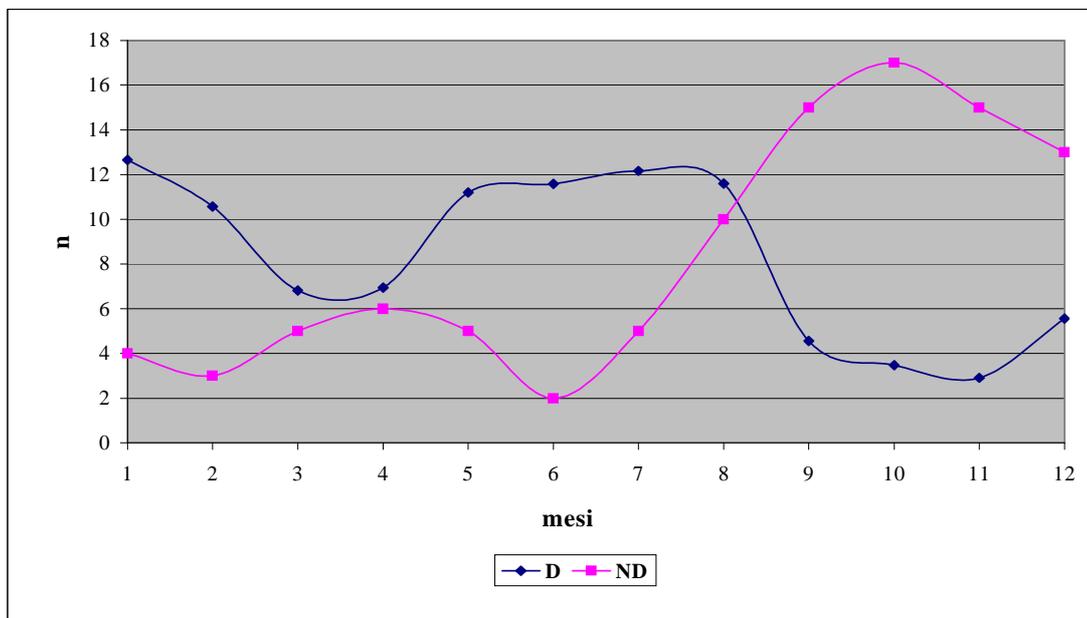
entro 70 giorni dal parto. Le modificazioni dell'assetto endocrino possono causare una mancata ripresa dell'attività ciclica ovarica e questo potrebbe avere un'influenza negativa quando le bufale ritornano cicliche. Questa condizione di "anaestro profondo" termina dopo 200 giorni essendo state esposte ad almeno due mesi di periodo a giorno breve [Zicarelli, 1994a].

Alcuni animali con mancato concepimento (5,3%), interrompono la gravidanza tra i 40 e 60 giorni dopo il concepimento. Inoltre, soggetti con anaestro temporaneo mostrano una mortalità embrionale del 16% [Zicarelli, 1994a]. Questo spiega anche perché l'attendibilità del dosaggio di progesterone nel latte per la diagnosi di gravidanza è minore in primavera rispetto all'autunno (64,3% vs 93,6%), a causa di un alto numero di cicli anomali e/o mortalità embrionale, scenario tipico del periodo primaverile [Campanile et al., 2005; 2007a]. L'età, il micro e il macroclima influenzano il quadro endocrino della bufala e ciò comporta un aumento dei soggetti aciclici. Le primipare e le bufale anziane (superiore ai 10 anni) mostrano più frequentemente anaestro. Il loro intervallo parto-concepimento è generalmente più lungo (circa 60 giorni) rispetto alle bufale pluripare. Il management povero durante i loro primi anni, lo stress della prima lattazione, la gestazione, il primo periodo postpartum o il puerperio influenzano la longevità della bufala, che tende

ad essere meno sensibile al fotoperiodo. Al contrario, le bufale anziane sono influenzate dalla stagione del parto. E' stato dimostrato recentemente che se le bufale primipare ricevono una dieta altamente energetica e con alto contenuto di amido mostrano una fertilità molto più alta delle pluripare [**Vecchio et al., 2007**].

### 1.3 Destagionalizzazione dei parti

L'esigenza di conciliare la richiesta di mercato di mozzarella di bufala con le caratteristiche riproduttive della specie ha indotto i tecnici operanti nel settore a ricercare strategie atte ad invertire il calendario dei parti cercando di concentrarli (e quindi la massima produzione latte) in determinati periodi dell'anno favorevoli al mercato della mozzarella. E' stata così messa a punto una vera e propria tecnica di destagionalizzazione dei parti [Zicarelli, 1997], che consiste nell'interrompere la promiscuità sessuale in inverno, togliendo il toro dalla mandria nel periodo Ottobre-Febbraio, per poi ripristinarla a Marzo (Figura 4).



**Figura 4.** Parti a termine durante un anno tra una mandria stagionale (ND) ed una destagionalizzata (D).

Tale tecnica, tuttavia, comporta una perdita di fertilità, che può variare dal 10 e al 35%, dovuta all'anaestro cui vanno incontro nei mesi primaverili soprattutto le bufale pluripare [Zicarelli, 1994a]. I vari trattamenti ormonali sono in grado, di solito, di mitigare gli effetti dell'aciclia, ma risultano inefficaci in molti casi [Zicarelli, 1994a]. Bisogna comunque tener presente che esistono bufale (soprattutto manze), che sono meno sensibili al fotoperiodo e si ingravidano senza problemi in primavera ed in estate [Di Palo et al., 1993; Borghese et al., 1995]. L'applicazione costante della destagionalizzazione porta ad una selezione naturale dei soggetti meno stagionali, ciò lascia supporre che la valutazione del grado di stagionalità nei piani futuri di selezione potrebbe portare a mandrie meno sensibili al fotoperiodo. In questo modo sarebbe più semplice per gli allevatori produrre latte nel periodo di maggiore richiesta. La tecnica di destagionalizzazione va però effettuata con grande cautela e avendo cura di accertare la ciclicità degli animali e valutando il grado di stagionalità della mandria scegliendo se applicare una tecnica drastica o soft per evitare una eccessiva perdita di redditività all'allevatore [Zicarelli 1997]. Non va dimenticato, infatti, il ridotto numero di cicli ovarici postpartum, cui si faceva riferimento in precedenza [Zicarelli, 1992] e dopo i quali, se non avviene il concepimento, subentra l'anaestro e si accentua la tendenza alla

stagionalità, determinando fenomeni di aciclia di lunga durata. In una mandria destagionalizzata può, quindi, verificarsi che alcune bufale, se non s'instaura una gravidanza prima dell'allontanamento dei tori, restino non gravide non solo nel periodo Ottobre-Febbraio, ma anche successivamente, per andare poi in calore solo l'anno successivo con l'avvento della nuova stagione riproduttiva (cioè nel successivo autunno).

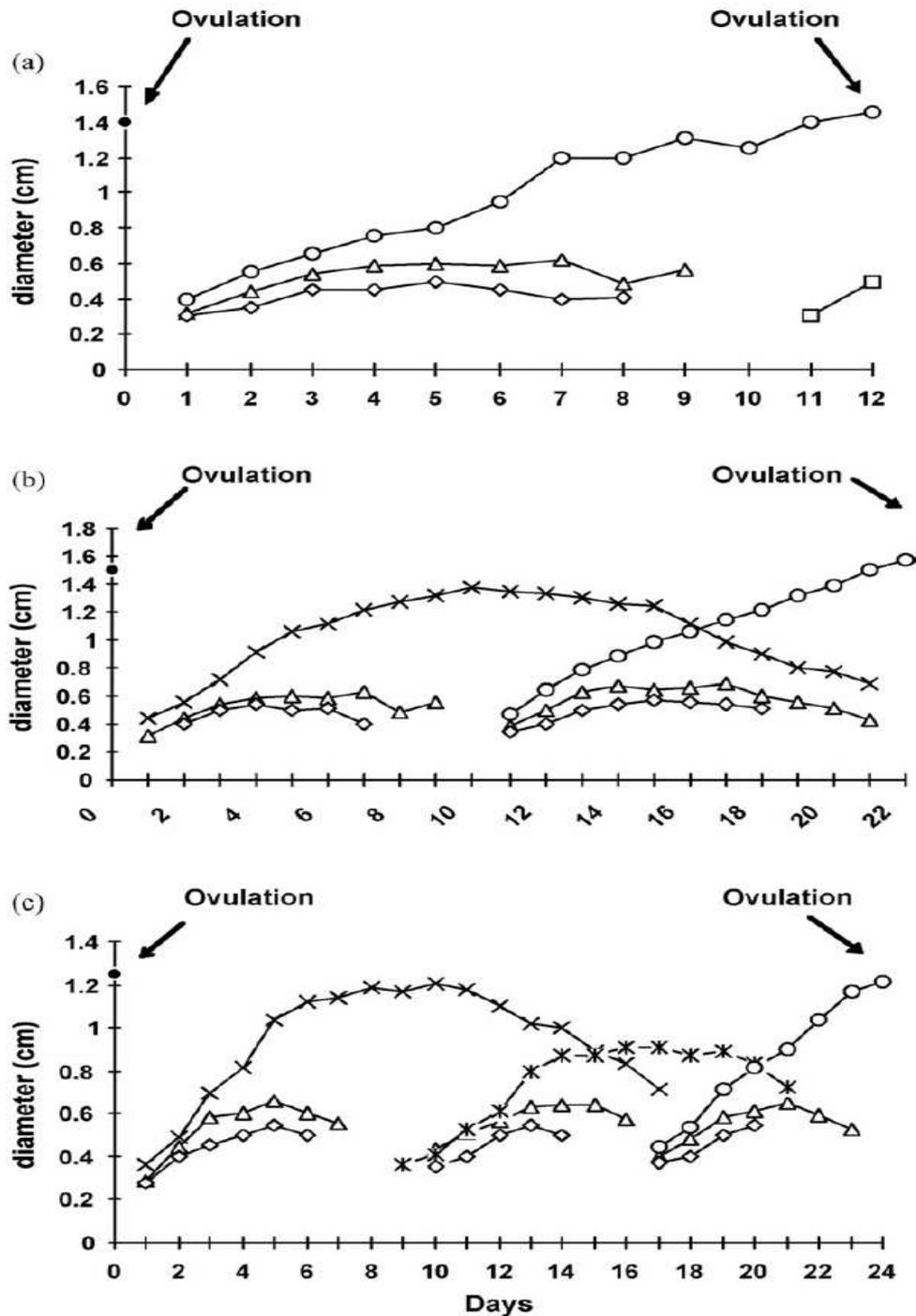
## 2. Ciclo estrale e funzione ovarica

Il bufalo è classificato come una specie a fotoperiodo breve , ma nelle zone equatoriali può mostrare cicli estrali durante l'anno a patto che l'alimentazione sia adeguata a sostenere la funzione riproduttiva [**Seren et al., 1995**]. I bufali diventano sempre più poliestrali stagionali all'aumentare della distanza dall'equatore [**Zicarelli, 1997; Baruselli et al., 2001a**] e le femmine che partoriscono al di fuori della stagione riproduttiva presentano un aumento del periodo dell'anaestro postpartum con assenza dell'ovulazione fino al sopraggiungere della stagione riproduttiva successiva [**Zicarelli, 2007**]. Il ciclo estrale nelle bufale può variare dai 16 ai 28 giorni [**Manik et al., 1994; Baruselli et al., 1997**] e nelle bufale che mostrano cicli estrali regolari, la durata dell'estro è tipicamente di 10-20 ore nel caso in cui gli animali ciclano durante la stagione riproduttiva. Le femmine che ciclano durante la stagione non riproduttiva possono mostrare una durata variabile dell'estro che va dalle 2 alle 72 ore [**Zicarelli et al., 1988b; Baruselli, 2001**]. Indipendentemente dalla stagione riproduttiva o non riproduttiva, le bufale rispetto alle bovine manifestano l'estro [**Ohashi, 1994**] e l'atteggiamento di monta in maniera meno evidente [**Roy et Prakash, 2009**]. Sembra che la minore intensità degli estri nelle bufale sia

associata, almeno in parte, a basse concentrazioni circolanti di E<sub>2</sub> rispetto alle bovine da latte [Seren et al., 1995]. Il follicolo preovulatorio nelle bufale è più piccolo di quello delle bovine da latte [Baruselli et al., 1997] e ciò potrebbe essere associato a bassi livelli di estradiolo. Nelle bufale l'intervallo fra la comparsa dell'estro e il picco di LH può variare da 1 a 12 ore [Gill et al., 1973; Rao et al., 1981; Vale et al., 1984; Seren et al., 1995] e l'ovulazione si realizza fra le 26 e le 33 ore dopo il picco di LH [Seren et al., 1995; Porto-Filho et al., 1999].

## 2.1 Sviluppo follicolare

Le bufale mostrano uno sviluppo dei follicoli ovarici ad ondate durante i cicli estrali in maniera molto simile a ciò che si realizza nelle bovine [Baruselli et al., 1997]. Nelle bufale le caratteristiche fondamentali del reclutamento follicolare, della selezione, della dominanza e dell'atresia durante un'ondata follicolare [Baruselli et al., 1997] sono simili a quelle descritte per le bovine [Sirois et Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Mapletoft et al., 1994]. Nelle bufale il numero delle ondate follicolari durante un ciclo estrale può variare da una a tre, ma due risulta essere la più frequente (63%; Baruselli et al., 1997; Presicce et al., 2004; Neglia et al., 2007). Nelle bovine sono stati riportati cicli estrali con 4 ondate follicolari [Rhodes et al., 1995], mentre nelle bufale non vi è alcun riscontro bibliografico in merito. Nelle bufale, 3 ondate follicolari si verificano nei cicli estrali che hanno la fase luteale più lunga e il maggior intervallo interovulatorio rispetto ai cicli che hanno 2 ondate follicolari (Figura 5).



**Figura 5.** Diametri standardizzati dei follicoli ovarici nelle bufale (O, follicolo dominante; Δ, follicolo subordinato più grande ; ◇, secondo follicolo subordinato più grande) con cicli estrali ad (a) 1 ondata, (b) 2 ondate e (c) 3 ondate (n = 10) [Baruselli et al., 1997].

La bufala presenta un minor numero di follicoli reclutati per ondata follicolare rispetto alla bovina [Danell, 1987; Ty et al., 1989]. Tuttavia in un recente studio [Gimenes et al., 2009], le bufale primipare hanno mostrato un reclutamento di follicoli in termini numerici simile a quello delle Holstein (*Bos taurus*) (rispettivamente  $13,1 \pm 1,4$  e  $15,0 \pm 2,8$  follicoli), comunque inferiore rispetto al numero reclutato nella Nelore (Zebu, *Bos indicus*) ( $29,7 \pm 3,1$  follicoli). Nonostante questi ultimi dati, nelle bufale il numero relativamente inferiore dei follicoli, tipico delle ondate follicolari, potrebbe essere correlato a una minore riserva di follicoli primordiali presente in questa specie (12.636) rispetto alla bovina (50.000, Danell, 1987). Inoltre le bufale tendono ad avere un maggior tasso di follicoli atresici (67%; Danell, 1987) rispetto alle bovine (50%; Rajakoski, 1960). Nelle bufale swamp è stato riscontrato che il numero dei follicoli antrali risulta essere soltanto il 20% rispetto a quello riscontrato nelle bovine [Ty et al., 1989]. Il numero dei follicoli non atresici ( $> 1,7$  millimetri) era compreso fra 1 e 5 (in media 3) per le bufale e fra 17 e 32 (in media 22) per le bovine [Ty et al., 1989]. Il numero dei follicoli reclutati nell'ambito delle ondate follicolari risulta essere relativamente costante per ogni bufala [Baruselli et al., 1997; Neglia et al., 2007] e ciò è stato anche osservato nelle bovine [Boni et al., 1993]. Dato che la risposta follicolare ai trattamenti di

superstimolazione ovarica sembra essere correlata al numero di follicoli disponibili ad essere reclutati all'inizio del trattamento nella bovina [Romero et al., 1991], è possibile ipotizzare che l'ereditarietà dei follicoli antrali non atresici potrebbe rivelarsi un importante parametro genetico per la selezione di bufale donatrici nei programmi di riproduzione assistita. A tal proposito la risposta follicolare alla superstimolazione ovarica è rimasta relativamente costante per ogni bufala [Misra et al., 1991].

La prima ondata follicolare nelle bufale è evidente al terzo giorno del ciclo estrale (giorno 0= estro ) [Baruselli et al., 1997]. Nei cicli a due ondate follicolari, la seconda ondata si realizza più tardi rispetto ai cicli con 3 ondate follicolari (rispettivamente giorno  $10,8 \pm 1,1$  e giorno  $9,3 \pm 1,2$ ) e ciò si verifica anche nella bovina [Sirois et Fortune, 1988; Fortune, 1993]. Nelle bufale l'accrescimento e le fasi statiche del follicolo dominante, della prima ondata, differiscono da quelle dei cicli estrali con 2 e 3 ondate follicolari. Il follicolo dominante della prima ondata di un ciclo estrale a 2 ondate ha una fase di crescita maggiore e un diametro più grande rispetto al follicolo dominante della prima ondata di un ciclo estrale a 3 ondate [Baruselli et al., 1997]. Il diametro massimo del primo follicolo dominante ( $13,3 \pm 1,8$  mm) nei cicli estrali a 3 ondate è maggiore rispetto al diametro massimo del secondo follicolo

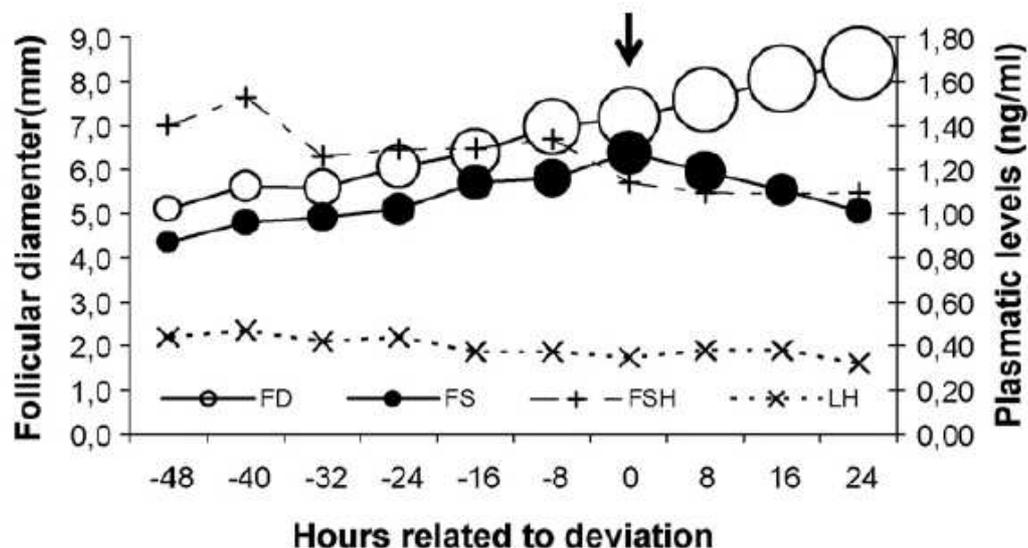
dominante ( $11,1 \pm 2,1$  millimetri) [**Baruselli et al., 1997; Figura 5**]. Nelle bufale il secondo follicolo dominante nei cicli estrali a 3 ondate si realizza nel momento in cui c'è la massima concentrazione di progesterone circolante, così come accade nella bovina [**Bergfelt et al., 1991; Sirois et Fortune, 1990; Adams et al., 1992; Bruke et al., 1994**]. Ciò deriva dal condizionamento del progesterone circolante sulle dimensioni del follicolo dominante attraverso la regolazione della secrezione di LH [**Savio et al., 1993**]. L'LH è importante per la steroidogenesi nei follicoli dominanti e la ridotta secrezione di LH priva i follicoli del substrato di androgeni per l'aromatizzazione, e ciò da inizio all'atresia [**Lucy et al., 1992**].

E' stato riportato che non vi sono differenze nel diametro massimo del primo follicolo dominante e il follicolo ovulatorio dei cicli estrali a 2 ondate (rispettivamente  $15,1 \pm 2,4$  e  $15,5 \pm 1,6$  mm,) e a 3 ondate (rispettivamente  $13,3 \pm 1,8$  e  $13,4 \pm 1,3$  millimetri,) nelle bufale Murrah [**Baruselli et al., 1997**]. Tuttavia **Neglia et al. (2007)** hanno registrato nelle bufale di razza Mediterranea Italiana un diametro massimo dei follicoli preovulatori maggiore rispetto al diametro dei follicoli dominanti di altre ondate follicolari del ciclo. Nella bovina, la dimensione assoluta sia del primo follicolo dominante che di quelli ovulatori risulta, invece, minore per i cicli estrali a 3 ondate [**Bergfelt et**

**al., 1991; Fortune, 1993**]. Le dimensioni follicolari osservate nello studio di **Baruselli et al. (1997)** erano simili alle dimensioni follicolari riportate per il *Bos taurus*, ma maggiori rispetto alle dimensioni follicolari precedentemente riportate per le bufale [**Manik et al., 1994**] e per gli zebù [**Barros et al., 1993**].

Nelle bufale la variazione nell'accrescimento del follicolo più grande (follicolo dominante DF) e del secondo follicolo più grande (follicolo subordinato SF) di un'ondata follicolare si verifica intorno a 2,6 giorni dopo la comparsa dell'ondata [**Gimenes et al., 2007**] così come si verifica anche nello Zebù [**Sartorelli et al., 2005; Gimenes et al., 2008**]. Nelle bufale al momento della variazione le dimensioni medie del follicolo dominante e del follicolo subordinato (rispettivamente 7,2 e 6,4 mm) sono maggiori rispetto a quelle riscontrate nello Zebù (rispettivamente 6,2 e 5,8 mm; **Gimenes et al., 2007**) , ma inferiori rispetto a quelle riscontrate nelle bovine da carne *Bos taurus* (rispettivamente 8,5 e 7,2 mm; **Ginther et al., 1996**). Nelle bovine da latte Holstein, le concentrazioni circolanti di FSH mostrano una diminuzione nel momento in cui si verifica la variazione del follicolo o subito dopo e le concentrazioni di LH mostrano un aumento transitorio precedente la selezione del follicolo [**Ginther et al., 2001**]. Queste

correlazioni fra FSH, LH e le dinamiche follicolari non sono state ancora chiarite nelle bufale [Gimenes et al., 2007; Figura 6].



**Figura 6.** Diametro (media  $\pm$  SEM) del follicolo dominante ( $\bigcirc$ , FD) e del follicolo subordinato piú grande ( $\bullet$ , FS), e profili di FSH e di LH normalizzati al giorno in cui si osserva la deviazione in 10 giovenche bufaline Murrah. La freccia indica l'inizio della deviazione [Gimenes et al., 2007].

La comparsa della seconda e della terza ondata follicolare nelle bufale è evidente due o tre giorni dopo l'inizio della fase statica del follicolo dominante precedente [Baruselli et al., 1997] e ciò è simile alla bovina [Ginther et al., 1989a; Fortune, 1993]. Questa osservazione nelle bufale e nelle bovine suggerisce che il follicolo dominante perde la sua dominanza all'inizio della fase statica, nonostante venga conservata la

dominanza morfologica [**Fortune et al., 1991**]. I follicoli subordinati di ogni ondata follicolare cessano di crescere dopo alcuni giorni. Una nuova ondata non emerge fintanto che il follicolo dominante è nella fase di accrescimento o allo stadio iniziale della fase statica [**Ginther et al., 1989a**].

Questi modelli di crescita follicolare ad ondate sono stati osservati nelle bufale Mediterranee Italiane prepuberi a 5-9 mesi di età [**Presicce et al., 2003**]. E' possibile che in queste giovani bufale l'ovaio non si trovi ancora nella fase di ondata follicolare ma possa avere un follicolo relativamente grande suggerendo che la dominanza follicolare non si è ancora stabilita. Sono state osservate fluttuazioni nell'FSH e nell'estradiolo in concomitanza con lo sviluppo follicolare, anche se i rapporti fra l'FSH e la comparsa dell'ondata follicolare risultano essere meno evidenti degli animali adulti [**Presicce et al., 2003**].

## **2.2 Risposta follicolare a ormoni esogeni: induzione dell'ovulazione**

**Gimenes et al. (2007)** riferiscono che i follicoli di bufale primipare provenienti dall'incrocio Mediterranea x Murrah acquisiscono la capacità di ovulare in risposta all'LH esogeno nel momento in cui raggiungono il diametro di 8,5-10 mm. Invece i follicoli di bufale Mediterranee pluripare con diametri che variano dai 4,2 ai 13,0 mm ovulano se trattati con hCG o agonisti del GnRH [**Campanile et al., 2007a, 2008**]. In quest'ultimo studio, i follicoli che variano fra i 4,2 e i 13,0 mm non sempre ovulano dopo il trattamento con hCG o con agonisti del GnRH suggerendo che la dimensione non riflette necessariamente lo stadio di sviluppo o la funzionalità del follicolo.

Nelle bufale che vanno incontro a regolari cicli estrali, i follicoli dominanti raggiungono una dimensione di 13 - 15 mm prima dell'ovulazione [**Baruselli et al., 1997; Neglia et al., 2007**] e ciò potrebbe essere interpretato suggerendo che, in condizioni normali, i follicoli nelle bufale acquisiscono la capacità di ovulare intorno ai 5 - 8 mm, ma devono subire un ulteriore sviluppo in modo tale da secernere sufficiente estradiolo per svolgere un'azione di feed-back positivo tale da indurre il picco preovulatorio di LH. A supporto di questa tesi, è stato riscontrato nelle bovine Holstein che i follicoli di 8,5 mm, essendo già

andati incontro a variazione follicolare, ovulano in genere a diametri maggiori di 10 mm [**Sartori et al., 2001**]. Gli autori ipotizzano che ciò potrebbe essere attribuito ad un aumento dei recettori dell'LH con sviluppo follicolare continuo.

### 2.3 Superstimolazione follicolare

La superstimolazione follicolare è più efficace quando l'inizio del trattamento esogeno con l'FSH viene effettuato in coincidenza con l'aumento dell'FSH endogeno che induce l'ondata e con l'emergere della seconda ondata follicolare. Ciò è difficile da raggiungere nelle bufale che ciclano in maniera casuale vista la notevole variazione nella durata della prima ondata follicolare [Baruselli et al., 1997]. L'ecografia può essere utilizzata per monitorare le ondate follicolari, ma ciò spesso non è praticabile e un metodo alternativo è quello di utilizzare trattamenti con ormoni esogeni per controllare la comparsa dell'ondata follicolare [Baruselli et al., 2002; Andrade et al., 2003; Baruselli et Carvalho, 2005]. Bufale iniettate con estradiolo all'inizio di un trattamento con progesterone di 7 giorni mostrano un'ondata follicolare sincrona 4-5 giorni dopo la fine del trattamento [Bartolomeu et al., 2002]. In uno studio recente [Gimenes et al., 2009] è stato osservato che l'intervallo fra i trattamenti con estradiolo e progesterone e l'insorgenza dell'ondata follicolare era simile fra bufale ( $4,5 \pm 0,2$  giorni), Holstein ( $4,4 \pm 0,2$  giorni) e Nelore (*Bos indicus*;  $4,2 \pm 0,2$  giorni). Questo trattamento con l'FSH può essere programmato in modo tale che coincida con la comparsa dell'ondata dopo sincronizzazione. Un secondo requisito per

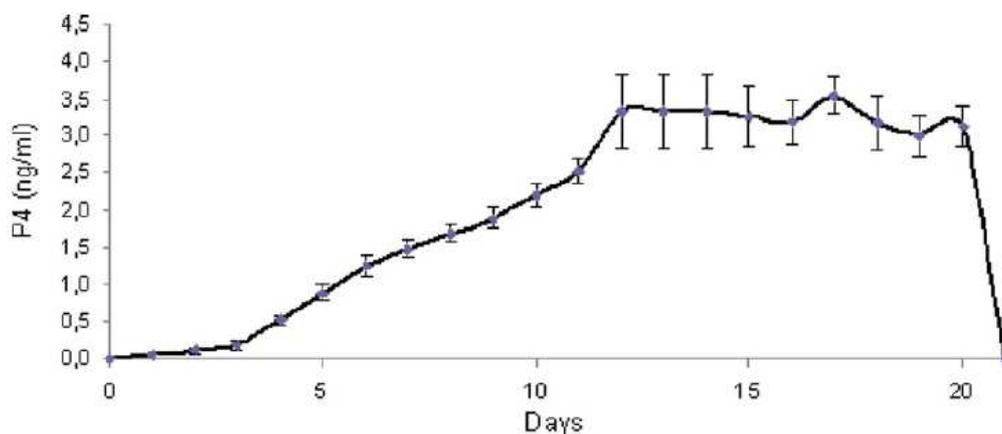
indurre superstimolazione follicolare è la possibilità di controllare il momento in cui avviene l'ovulazione al fine di fissare il momento in cui sia possibile effettuare l'inseminazione artificiale (AI). L'iniezione di GnRH o LH di suino 24 ore dopo l'ultimo trattamento con FSH determina ovulazione predittiva e sincrona in bufale in cui si può rimuovere il bisogno dell'accertamento dell'estro per AI [**Baruselli et al., 2002**]. In un protocollo di superstimolazione che utilizzava un agonista del GnRH per controllare l'attività dell'adenoipofisi nelle bufale, la somministrazione di LH di suino 24 h dopo l'ultima iniezione di FSH è associata a un maggior tasso di ovulazione, fertilizzazione e recupero degli embrioni rispetto alle iniezioni di LH 12 ore dopo l'ultima iniezione di FSH [**Zicarelli et al., 2000**]. L'iniezione di LH a 12 h induce la luteinizzazione del follicolo senza ovulazione [**Zicarelli et al., 2000**], mentre l'iniezione di LH a 36 ore dopo l'ultima iniezione di FSH induce l'ovulazione solo in una piccola percentuale di bufale [**Carvalho et al., 2002**].

Si può concludere che è possibile controllare la comparsa del follicolo all'inizio di un protocollo di superstimolazione e può essere effettuato il controllo dell'ovulazione alla fine del protocollo nei programmi di ovulazione multipla ed embryo transfer nelle bufale.

## 2.4 Corpo Luteo

Il corpo luteo (CL) è una struttura endocrina che si sviluppa dopo l'ovulazione e svolge un ruolo fondamentale nel controllo della riproduzione nei mammiferi [Niswender et Nett, 1994; Niswender et al., 2000; Diaz et al., 2002]. In assenza del concepimento la regressione del corpo luteo e, quindi, la sospensione della secrezione di progesterone, è necessaria sia per l'avvio di una nuova ondata follicolare ovarica sia per l'inizio del ciclo estrale successivo. Nelle bufale il peso del corpo luteo, alla metà della fase luteale, varia fra gli 1 e 1,5 grammi [El-Sheikh et al., 1967; Ghosh et Mondal, 2006] e, quindi, inferiore rispetto al peso del corpo luteo registrato alla stessa epoca nelle bovine. Le dimensioni relativamente ridotte del corpo luteo nelle bufale potrebbero spiegare, almeno in parte, la ridotta secrezione di progesterone e concentrazioni inferiori di progesterone circolante in questa specie [Mondal et Prakash, 2004]. Un'altra caratteristica del corpo luteo nelle bufale è quella di possedere un colorito grigio chiaro rispetto al tipico colore arancio delle bovine, ciò è dovuto al fatto che le bufale possiedono ridotte riserve di Beta-carotene nei tessuti [Ghosh et Mondal, 2006]. Nei cicli estrali regolari, il corpo luteo nelle bufale secerne progesterone per circa 15 giorni e le concentrazioni massime di

progesterone circolante variano dai 5 ai 12 ng/ml fra il 6 e il 16 giorno del ciclo estrale [Seren et al., 1995]. Si è visto come la regressione del corpo luteo nelle bufale è un processo che si realizza in tempi molto più lunghi rispetto alle bovine il tutto basato su una diminuzione graduale delle concentrazioni di progesterone circolante (**Figura 7**) [Danell, 1987; Avallone et al., 1988].



**Figura 7.** Concentrazioni di progesterone plasmatico (P4) durante il ciclo estrale nelle bufale [Avallone et al., 1988].

A supporto di questa tesi nelle bufale il rapporto fra RNA/DNA delle cellule luteiniche non si modifica durante le fasi di sviluppo, crescita e regressione [Ghosh et Mondal, 2006]. Sulla base del peso dei tessuti, la quantità totale di DNA ed RNA non differisce fra le diverse fasi di sviluppo (inizio, metà e fine) del tessuto luteinico nelle bufale [Ghosh et Mondal, 2006]. Il contenuto proteico è, comunque, inferiore in quei

tessuti pesati durante la fase di regressione del corpo luteo [**Ghosh et Mondal, 2006**]. Nel bovino, è stato riportato che il rapporto fra RNA/DNA diminuisce durante la fase di regressione del corpo luteo [**Hafs et Armstrong, 1968; Mares et al., 1962**]. La biosintesi del progesterone richiede il trasporto del colesterolo fino alla membrana mitocondriale interna che è un processo dipendente da una proteina steroidea regolatrice acuta (Star) [**Stocco, 2001**]. In uno studio in vitro, il tessuto luteinico dal 20mo giorno del ciclo estrale ha una espressione della proteina STAR relativamente maggiore e questo è stato associato ad elevate concentrazioni di progesterone circolante [**Kumar et al., 1991**]. Ciò suggerisce che il tessuto luteinico dal 20mo giorno del ciclo estrale nelle bufale sintetizza e secerne attivamente progesterone. Le bovine da latte, invece, mostravano una ridotta espressione della proteina STAR verso la fine del ciclo estrale [**Pescador et al., 1996**]. Le osservazioni contrastanti rilevate sia per le bufale che per le bovine da latte potrebbero suggerire l'esistenza di differenze a livello molecolare nei meccanismi che regolano la funzione del corpo luteo. Nelle bovine, il flusso sanguigno e la vascolarizzazione del corpo luteo sono strettamente correlate con la sintesi e la secrezione del progesterone [**Stormshak et al., 1963; Kobayashi et al., 2001**]. Relazioni simili fra la densità vascolare e la sintesi del progesterone sono state anche osservate nelle

bufale nel mezzo e alla fine delle fasi luteali [**Asahara et al., 1995; Zimmermann et al., 2001**]. In studi recenti, condotti nella specie bufalina, è stato osservato che l'espressione del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) nel corpo luteo varia durante il ciclo estrale ed è correlato alle concentrazioni di progesterone circolante, come si verifica anche nella bovina [**Papa et al., 2007**]. E' interessante notare come i recettori per il VEGF, sono espressi sulle cellule luteali suggerendo che il VEGF potrebbe influenzare la steroidogenesi nel corpo luteo bufalino indotto da meccanismi ancora poco conosciuti [**Kashida et al., 2001**]. Nonostante la necessità di comprendere in maggior dettaglio le relazioni esistenti fra VEGF e la funzione del corpo luteo, si potrebbe concludere affermando che la funzione della suddetta ghiandola endocrina e l'angiogenesi sono strettamente correlate. Nelle bufale la prima ovulazione postpartum si verifica generalmente fra il 25mo e il 70mo giorno [**El-Wishy, 2007**] e il primo estro postpartum fra il 44mo e l'87mo giorno. Il primo corpo luteo postpartum è spesso caratterizzato da una fase luteale inferiore (6-13 giorni) e da concentrazioni di progesterone circolante relativamente più basse. Cicli estrali brevi (<18 giorni) alla ripresa dell'ovulazione postpartum si realizzano nel 25-45% delle bufale [**Perera et al., 1988; Khattab et al., 1990; Barkawi, 1993; Abdalla, 2003**]. Altri fattori che possono

influenzare la funzione del corpo luteo nelle bufale riguardano la stagione e la presenza del maschio. Durante il periodo di transizione stagionale, che corrisponde a metà inverno nell'area mediterranea, la funzione del corpo luteo, come testimoniato dalle dimensioni dello stesso e dalle concentrazioni di progesterone circolante può essere ridotta del 5-50% [**Campanile et al., 1992**]. Uno scenario tipico per le bufale nel periodo di transizione è un progressivo declino nell'attività delle cellule luteiniche nei cicli successivi prima di entrare in anaestro [**Zicarelli et al., 1988a**]. Quest'ultimo è molto più probabile che si verifichi in bufale di 8 anni di età o più. In un gruppo la proporzione di femmine che mostrano riduzione del progesterone con l'avvicinarsi dell'inizio dell'anaestro è ridotta dalla presenza del toro bufalino [**Zicarelli et al., 1997**].

## 2.5 Corpo luteo e sincronizzazione dell'estro

In condizioni di cicli estrali regolari e di una normale funzione del corpo luteo la risposta delle bufale alla sincronizzazione degli estri con PGF2 $\alpha$  è simile a quella che si ottiene nella bovina [Zicarelli et al., 1997]. Di conseguenza, la PGF2 $\alpha$  non svolge un'azione litica sul corpo luteo sia quando viene somministrata 4-5 giorni prima del ciclo sia dopo il sedicesimo giorno [Acosta et al., 2002; Neglia et al., 2008]. Nelle bufale una caratteristica peculiare della risposta alle PGF2 $\alpha$  si verifica quando gli animali stanno per entrare in anaestro. Se un gruppo di bufale ha all'incirca il 50% di femmine che mostrano attività ciclica, successivamente in risposta alle PGF2 $\alpha$  approssimativamente il 30% diviene aciclico e la fertilità risulterà essere relativamente bassa al momento dell'inseminazione artificiale su estro sincronizzato. D'altra parte, la maggior parte delle femmine che mostrano attività ciclica al momento del trattamento con la PGF2 $\alpha$ , rimane ciclica e presenta un alto tasso di fertilità con inseminazione artificiale su estro sincronizzato [Zicarelli et al., 1988a]. Queste ricerche suggerirebbero che trattamenti con la PGF2 $\alpha$  potrebbero indurre anaestro in quelle bufale già vicine a presentare tale patologia. E' stato riportato che bufale con un corpo luteo di dimensioni relativamente grandi ( $\geq 1.5$  cm) al momento della

sincronizzazione con PGF2 $\alpha$  presentano un tasso di fertilità più elevato al momento dell'inseminazione artificiale rispetto a bufale aventi un corpo luteo di dimensioni inferiori ( $\leq 1.1$  cm) [**Di Palo et al., 1990**]. È stato, inoltre, riscontrato che bufale con un corpo luteo piccolo e con basse concentrazioni di progesterone circolante mostrano un ridotto tasso di ovulazione dopo sincronizzazione con PGF2 $\alpha$  [**Brito et al., 2002**]. In un recente studio è stato osservato che il diametro del corpo luteo non è stato direttamente correlato con le concentrazioni di progesterone e il tasso di gravidanza è risultato più elevato in quelle bufale che hanno mostrato un maggior afflusso di sangue a livello del corpo luteo [**Russo et al., 2010**].

Quest'ultimo studio ha dimostrato che la misurazione delle dimensioni del corpo luteo non fornisce delle indicazioni precise circa la funzionalità ed è necessario far ricorso all'eco color doppler in modo da valutare con precisione lo stato del corpo luteo e la probabile fertilità in risposta alla sincronizzazione con le PGF2 $\alpha$ .

Bufale con ridotta vascolarizzazione del corpo luteo hanno, inoltre, fatto registrare un maggior indice di resistenza sanguigno del corpo luteo al 25mo giorno dopo l'inseminazione artificiale e questo è risultato associato ad una ridotta crescita fetale [**Campanile G.** risultati non pubblicati].

## **2.6 Importanza dell'irrorazione del follicolo preovulatorio e del corpo luteo**

I cambiamenti emodinamici sono coinvolti nel rimodellamento ciclico del tessuto ovarico che avviene durante la fase finale della crescita follicolare, l'ovulazione e lo sviluppo del nuovo corpo luteo [**Moor et al., 1975; Collins et al., 1991; Brannstrom et al., 1998; Acosta et al., 2002**]. Un'estesa formazione vascolare (angiogenesi) e differenziazione cellulare (luteinizzazione) si verificano nella parete follicolare nel periodo che va tra il picco di LH e l'iniziale sviluppo del corpo luteo. Con l'ovulazione il follicolo collassa e rilascia la cellula uovo e il liquido antrale. Quando la membrana basale è distrutta, nuovi vasi sviluppano dalla preesistente vascolarizzazione. L'intensità di questo processo angiogenetico raggiunge un picco 2-3 giorni più tardi nel giovane corpo luteo.

L'ecografia color doppler è un utile e non invasiva tecnica per valutare la funzione della vascolarizzazione ovarica, permette la visualizzazione del flusso sanguigno in un'area delimitata della parete del follicolo preovulatorio [**Brannstrom et al., 1998**] o all'interno del corpo luteo [**Miyazaki et al., 1998; Acosta et al., 2002**]. Queste immagini hanno facilitato gli studi emodinamici e consentito delle misurazioni

riproducibili [**Collins et al., 1991; Brannstrom et al., 1998; Acosta et al., 2002**]. Un recente studio ecografico che si proponeva di investigare il cambio regionale del flusso del sangue nei follicoli di donne, ha dimostrato che il flusso sanguigno è ugualmente distribuito nel follicolo dominante durante l'ultima fase follicolare e prima del picco di LH. Comunque, dopo il picco di LH, c'è un cambiamento prominente nel flusso di sangue regionale del follicolo, con un aumento marcato del flusso alla base e una concomitante diminuzione del flusso all'apice [**Brannstrom et al., 1998**]. Così, la determinazione del flusso sanguigno nei follicoli preovulatori singoli, prima dell'aspirazione follicolare per le terapie IVF fornisce un importante indice sull'ambiente intrafollicolare e può predire lo sviluppo dell'oocita corrispondente [**Coulam et al., 1999; Huey et al., 1999**].

L'LH induce un aumento nel flusso del sangue ovarico nei ratti [**Varga et al., 1985**], conigli [**Janson, 1975**], e pecore [**Niswender et al., 1976**]. Comunque, il meccanismo che induce questa iperemia LH dipendente rimane sconosciuto. L'LH non ha un effetto diretto sui vasi, ma **Acosta et al. (1999)** hanno ipotizzato che la stimolazione dell'LH possa avere un ruolo di mediatore su sostanze vasoattive che agiscono sul follicolo preovulatorio bovino. Le sostanze vasoattive svolgono un ruolo importante nell'ovulazione così come nello sviluppo precoce del corpo

luteo, andando a modulare la secrezione locale di prostaglandine e ormoni steroidei [Acosta et al., 1999, 2000; Kobayashi et al., 2002].

Uno dei punti cardine per comprendere il ruolo delle sostanze vasoattive nella fisiologia ovarica è che esse determinano un cambio nel profilo del flusso sanguigno locale nel singolo follicolo e nel corpo luteo durante le varie fasi del ciclo estrale.

Nella bovina (*Bos taurus*) i follicoli preovulatori sono ben vascolarizzati con un rintracciabile flusso sanguigno intorno all'antro nella base del follicolo. Con una buona vascolarizzazione si sviluppa sia un buon follicolo preovulatorio che un buon corpo luteo [Acosta et al., 2003].

Nelle vacche con ovulazione spontanea, la concentrazione plasmatica di estradiolo gradualmente aumenta da 2.1 pg ml<sup>-1</sup> a - 24h a 4.7 pg ml<sup>-1</sup> all'inizio del picco di LH.

Le immagini color doppler del follicolo preovulatorio delle vacche sia con ovulazione spontanea che con ovulazione indotta con GnRH mostrano un flusso sanguigno che è limitato all'area basale del follicolo 48h dopo l'iniezione delle prostaglandine, quando la concentrazione di LH è basale. Questa area corrisponde a  $0,06 \pm 0,02$  cm<sup>2</sup> in entrambi i gruppi. Nelle vacche con ovulazione spontanea, l'area del flusso aumenta gradualmente in parallelo con la concentrazione plasmatica di estradiolo e rimane tale fino all'ovulazione. Comunque, dopo l'iniezione

di GnRH l'area del flusso si estende all'interno della parete follicolare occupando  $0,15 \pm 0,03 \text{ cm}^2$  dopo 30 minuti. Questi valori rimangono più alti ( $P < 0,05$ ) di quelli osservati prima del picco spontaneo o indotto dal GnRH.

Nella parete del follicolo preovulatorio, il TAMXV (time averaged maximum velocity) ,cioè la media delle velocità massime registrate, è stato rilevato durante l'aumento plasmatico della concentrazione di LH in entrambi i gruppi. Comunque negli animali con l'ovulazione indotta dal GnRH, il TAMXV è aumentato in maniera sincrona con il flusso nell'area e resta relativamente stabile fino all'ovulazione. Nelle vacche che hanno ovulato spontaneamente invece, il flusso di sangue nell'area del follicolo inizia ad aumentare quando la concentrazione di LH rimane ancora bassa.

Nel corpo luteo giovane, il flusso del sangue nella zona aumenta gradualmente in parallelo con l'aumento di volume del corpo luteo, la concentrazione plasmatica di progesterone, e il TAMXV dalle 48 alle 120 ore dopo l'ovulazione. Tra le 72h e le 96h, il flusso di sangue nell'area e il volume del corpo luteo aumentano del doppio o del triplo, indicando una angiogenesi attiva e un normale sviluppo del corpo luteo. I risultati dello studio di **Acosta et al. (2003)** forniscono una prima prova visibile del cambiamento temporaneo del flusso sanguigno all'interno

della parete follicolare di bovine con ovulazione spontanea o indotta da GnRH. Le immagini del follicolo preovulatorio rivelano che l'area del flusso del sangue e il TAMXV sono temporalmente associate con l'aumento della concentrazione plasmatica dell'estradiolo e con il picco di LH. Il risultato ci indica che c'è una correlazione funzionale tra il flusso del sangue nella parete follicolare e la concentrazione plasmatica di estradiolo e di LH nella fase preovulatoria delle bovine. Il primo rilevabile aumento della concentrazione dell'estradiolo plasmatico coincide con la vascolarizzazione (presenza flusso di sangue nell'area del follicolo dominante) della parete follicolare. Questi risultati concordano con studi precedenti nei quali è stato dimostrato che il diametro follicolare, la concentrazione di estrogeni nel fluido follicolare e l'area vascolare sono parametri strettamente associati [**Mattioli et al., 2001**]. Gli estrogeni in particolare sono stati ritenuti fattori essenziali nella regolazione del flusso sanguigno nel tratto riproduttivo [**Moor et al., 1975**].

Dopo l'iniezione di GnRH, sia il flusso ematico follicolare che la concentrazione plasmatica di LH e estradiolo aumentano simultaneamente. Questo fenomeno può indurre un cambiamento acuto nelle funzioni metaboliche delle cellule follicolari, che esita nell'aumento della produzione di steroidi e sostanze vasoattive. Gli

estrogeni possono causare una rapida dilatazione dei vasi sanguigni attivando l'ossido nitrico sintetasi endoteliale (eNOS). In uno studio su cellule endoteliali di arterie intatte di agnello, si è visto che il trattamento con estradiolo determinava un'attivazione rapida dell'eNOS, che veniva pienamente inibita da un concomitante trattamento con recettori per estrogeni (RE)  $\alpha$  antagonista, suggerendo che gli effetti a breve termine degli estrogeni sono mediati da RE $\alpha$  [Chen et al., 1999]. Queste sostanze vasodilatatrici locali agiscono direttamente nella regolazione del flusso sanguigno nell'ovaio.

L'aumento del flusso del sangue nella parete del follicolo preovulatorio può aumentare la disponibilità di gonadotropine, nutrienti e substrati ormonali e altri componenti ematici necessari all'ovulazione e alle cellule follicolari.

E' stato dimostrato che l'LH non altera la pressione del sangue, ma diminuisce la resistenza vascolare nelle ovaie di ratti [Varga et al., 1985]. In considerazione di un mancato effetto diretto dell'LH sulla vascolarizzazione, si suppone l'intervento di mediatori vasoattivi che vengono rilasciati durante la stimolazione dell'LH [Acosta et al., 1999]. Dopo il picco di LH, il flusso di sangue diminuisce all'apice del follicolo, mentre aumenta alla base dei follicoli umani [Brannstrom et al., 1998]. Fattori paracrini e autocrini prodotti dall'ovaio sono anche

critici per la rottura follicolare [Pepperell et al., 1995; Yoshimura, 1997]. Diversi studi hanno dimostrato che sostanze vasoattive che derivano dall'endotelio, fibroblasti, leucociti e cellule follicolari interagiscono tra loro modificando l'azione delle gonadotropine sulle ovaie [Brannstrom et al., 1993; Tedeschi et al., 1994].

In uno studio in vitro, effettuato su follicoli maturi isolati da ovaia bovine (*Bos taurus*), è stato dimostrato che l'infusione dell'LH ha aumentato l'endotelina 1 prodotta dalle cellule della teca [Acosta et al., 1999]. Ulteriori studi hanno, inoltre, dimostrato che l'angiotensina II, l'endotelina 1 e il peptide natriuretico atriale aumentano la secrezione di PGs follicolari e modificano la steroidogenesi [Acosta et al., 1999]. Ciò potrebbe indicare che c'è una interazione tra i componenti vascolari (cellule endoteliali) e le cellule follicolari steroidogeniche responsabile della modulazione del cambio locale nel flusso del sangue.

Il picco di LH induce cambi strutturali imponenti nella matrice extracellulare ovarica come una redistribuzione del flusso del sangue nella parete follicolare alcune ore prima dell'ovulazione [Espey, 1994]. La degradazione degli strati di collagene nella parete follicolare è accompagnata dall'aumento della dilatazione vascolare e della permeabilità [Murdoch et al., 1986]. Con l'ovulazione, il follicolo collassa e rilascia l'oocita e il fluido antrale. C'è una perdita della

membrana basale e nuovi vasi si sviluppano dalla preesistente vascolarizzazione tecale. Questo periodo di intensa angiogenesi continua con lo sviluppo del nuovo corpo luteo. Come risultato di questo processo, il corpo luteo diviene uno dei più vascolarizzati organi e riceve la maggiore quantità di flusso sanguigno per unità di tessuto rispetto ad ogni altro organo del corpo [**Wiltbank et al., 1988**]. L'aumento marcato del flusso del sangue e del volume del corpo luteo sono strettamente associate con il potenziale rilascio di progesterone, e di riflesso con un parallelo aumento della concentrazione della progesteronemia, che indica un normale sviluppo del corpo luteo.

In conclusione, i dati confermano il concetto che il complesso strutturale e i cambiamenti funzionali indotti dal picco di LH nel follicolo maturo sono strettamente associati con un incremento locale del flusso sanguigno all'interno della parete del follicolo preovulatorio. Questa informazione può essere preziosa per gli studi futuri che riguardano il controllo farmacologico del flusso sanguigno per cambiare le funzioni ovariche.

### **3. Sviluppo e perdita embrionale**

#### **3.1 Sviluppo embrionale**

Lo sviluppo embrionale nelle bufale è anticipato di 12-24 ore rispetto allo sviluppo embrionale nelle bovine e ciò è stato dimostrato sia in studi condotti in vitro [Neglia et al., 2001] che in vivo [Gasparrini, 2002]. L'avanzato sviluppo embrionale nelle bufale è associato con un precoce ingresso degli embrioni bufalini nell'utero all'incirca 4-5 giorni dopo l'estro [Karaivanov et al., 1987; Anwar et Ullah, 1998]. Nelle bovine, gli embrioni si trovano localizzati in utero a circa sei giorni dopo l'estro. Nelle bufale le morule sono state osservate a partire dal quinto giorno dopo l'estro e le blastocisti intorno al sesto giorno [Neglia et al., 2001]. In studi differenti è stato riportato che l'incubazione in vivo di embrioni bufalini derivati si realizza a partire dal quinto al settimo giorno [Gasparrini, 2002; Karaivanov et al., 1987; Drost et Elsdén, 1985; Chantaraprateep et al., 1989; Zicarelli et al., 1992]. Nelle bufale l'allungamento embrionale si pensa che avvenga intorno al 13mo giorno, la fase di pre-annidamento dal 17mo al 24mo giorno, mentre la fase di annidamento transitorio inizia intorno al 25mo giorno [Campanile et Neglia, 2007]. Nelle bufale inoltre è stato riportato che la  $\beta$  glicoproteina

associata alla gravidanza incrementa a partire dal 25mo giorno [**Karen et al., 2007**].

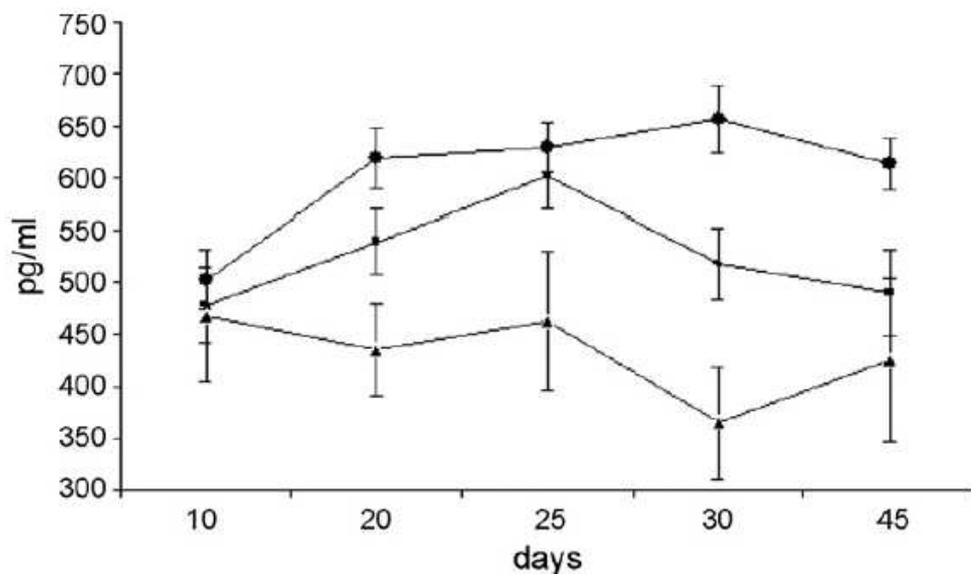
Come descritto sopra, nelle bufale il progesterone circolante raggiunge concentrazioni indicative di un corpo luteo funzionale ( $\geq 1,5$  ng / ml) intorno al sesto giorno del ciclo estrale [**Avallone et al., 1988; Seren et al., 1995; Campanile et al., 2007a**]. Il progesterone è essenziale affinché si realizzino quelle condizioni ambientali uterine indispensabili per lo sviluppo embrionale.

Poiché gli embrioni possono entrare in utero a partire dal quarto-quinto giorno e l'incubazione si può verificare già a partire dal quinto giorno, si potrebbe concludere che la formazione del corpo luteo e l'inizio della secrezione del progesterone nelle bufale risultano essere di fondamentale importanza. Un ritardo nella secrezione significativa di progesterone, eventualmente di sole 24 ore, può sfociare in un ambiente uterino che non risulta essere idoneo all'impianto embrionale. Questi scenari suggeriscono che lo sviluppo embrionale e quello del corpo luteo sono molto più correlati nelle bufale che nelle bovine [**Psychoyos, 1973; Paria et al., 1993; Dey, 1996**]. A supporto di ciò, i tassi di gravidanza nelle bufale sembrano essere correlati alle concentrazioni di progesterone circolante al quinto giorno [**Campanile et al., 2007a**].

### 3.2 Mortalità embrionale e fetale

Nelle bufale il periodo in cui si può realizzare la mortalità embrionale può variare fra il 15mo e il 24mo giorno (mortalità embrionale precoce) e fra il 25mo e il 45mo giorno (mortalità embrionale tardiva), mentre la mortalità fetale in genere si realizza fra il 46mo e il 90mo giorno [Vecchio et al., 2010]. Nelle bufale che mostrano cicli estrali regolari, la mortalità embrionale precoce può essere determinata da una inadeguata secrezione di progesterone in grado di supportare lo sviluppo embrionale e dalle caratteristiche dell'embrione che sono indipendenti dal progesterone. A supporto del ruolo svolto dal progesterone nella mortalità embrionale precoce, è stato osservato che bufale trattate con PGF2 $\alpha$  al momento dell'inseminazione artificiale avevano maggiori concentrazioni di progesterone circolante al 10mo e al 20mo giorno rispetto alle bufale non trattate e che i soggetti trattati facevano registrare un incremento di fertilità del 15% [Neglia et al., 2008]. Le bufale che si avviano verso l'anaestro stagionale mostrano anche un incremento nel progesterone sopra i livelli normali in risposta al trattamento con agonisti del GnRH al quinto giorno dopo l'inseminazione artificiale. Questi animali hanno un tasso di gravidanza maggiore al 40mo giorno rispetto a quelle bufale che non mostrano un incremento nel progesterone dopo

trattamento con un agonista del GnRH [Campanile et al., 2007c, 2008]. In relazione alla mortalità embrionale tardiva (25-45 giorni) le concentrazioni di progesterone sono tipicamente normali al 10mo giorno dopo l'inseminazione artificiale, ma subiscono un progressivo declino subito dopo [Figura 8; Russo et al., 2010].



**Figura 8.** Concentrazioni di progesterone nel siero di latte (pg/ml) ai giorni 10, 20, 25, 30, e 45 dopo l'inseminazione artificiale nelle bufale gravide (●), bufale che sono andate incontro a mortalità embrionale tardiva (▲) e bufale che sono andate incontro a mortalità fetale (■) [Russo et al., 2010].

La diminuzione del progesterone dopo il 10mo giorno può avere delle implicazioni che sono correlate al ruolo del progesterone nella regolazione dell'espressione del MUC-1 nell'epitelio uterino.

L'espressione dei recettori trans membrana delle MUC-1 è presente anche nella specie bufalina [**Perucatti et al., 2006**], e rappresentano un ostacolo allo sviluppo della blastocisti [**Geisert et Malayer, 2000**]. Il progesterone riduce l'espressione di MUC-1 favorendo l'impianto della blastocisti, mentre la diminuzione del progesterone a partire dal 10mo giorno è associata ad un incremento della mortalità embrionale tardiva, in quanto una riduzione del progesterone circolante provocherebbe una continua espressione di MUC-1 alterando i normali processi di impianto. Le bufale che vanno incontro a mortalità fetale (46-90 giorni) possono avere livelli di progesterone normale al 25mo giorno, ma di solito diminuiscono fra il 30mo e il 45mo giorno dopo l'inseminazione artificiale (**Figura 8**) [**Vecchio et al., 2010**].

# **PARTE SPERIMENTALE**

#### **4. Scopo del lavoro**

La tematica affrontata in questa tesi mira a chiarire alcuni aspetti che influenzano la funzionalità del corpo luteo e il successo dell'inseminazione strumentale nella specie bufalina. Pertanto Sono state programmate prove sperimentali utili a comprendere l'influenza della stagionalità riproduttiva sull'attività del corpo luteo, sull'instaurarsi e sul mantenimento della gestazione. Ciò è risultato utile per verificare alcune delle cause che hanno influenzato la perdita embrionale e mettere a punto protocolli farmacologici utili a migliorare la fertilità nella specie bufalina.

Il piano sperimentale ha, pertanto, previsto differenti fasi e, precisamente:

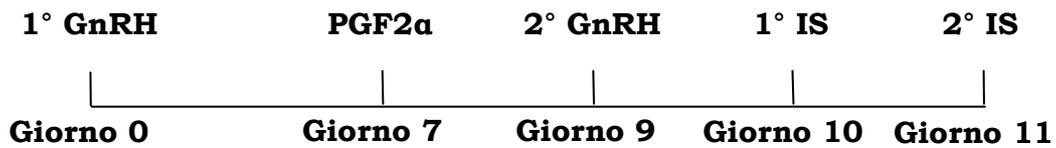
- a) Vascolarizzazione del follicolo e del corpo luteo e mortalità embrionale tardiva nella specie bufalina (esperimento 1).**
- b) Influenza della stagione sulla funzionalità del corpo luteo e riflessi sull'efficienza dell'inseminazione strumentale nella specie bufalina (esperimento 2).**
- c) Effetto del trattamento tardivo con GnRH, hCG e progesterone sulla fertilità della bufala (esperimento 3).**

## **5. Esperimento 1: Vascolarizzazione del follicolo e del corpo luteo e mortalità embrionale tardiva nella specie bufalina**

### **5.1 Materiali e metodi**

La prova è stata condotta su 72 bufale adulte pluripare di razza Mediterranea Italiana, allevate a stabulazione libera in 2 aziende delle province di Napoli e Caserta. Le bufale presentavano mediamente una distanza dal parto di  $183 \pm 77$  giorni e un ordine di parto di  $2,8 \pm 2,0$  ed erano stabulate su paddoks in cemento con uno spazio disponibile di circa  $15 \text{ m}^2/\text{capo}$ . I soggetti ricevevano una dieta somministrata con tecnica *Unifeed* caratterizzata da una densità energetica di 0,90 UFL/kg di sostanza secca, una concentrazione in proteine grezze del 15% e una percentuale di foraggi del 50-55%. La scelta delle bufale da utilizzare per l'espletamento di questo esperimento è stata effettuata tenendo conto dello stato di ciclicità e dell'assenza di eventuali anomalie a carico dell'apparato genitale. Le bufale scelte sono state successivamente sottoposte a sincronizzazione dell'ovulazione e inseminazione strumentale (IS) a tempo fisso utilizzando il programma Ovsynch-Tai (Synchronization of Ovulation and Timed Artificial Insemination) [Pursley et al., 1995; Neglia et al., 2003].

Tale trattamento consiste nel somministrare una dose di GnRH agonista al giorno 0 e al giorno 9, intervallate da una iniezione di  $\text{PGF}_{2\alpha}$  al giorno 7 (**Figura 9**).



**Figura 9.** Schema di utilizzo del protocollo Ovsynch-Tai Program.

La prima iniezione di GnRH ha la funzione di determinare l'ovulazione o la luteinizzazione di un eventuale follicolo dominante presente sull'ovaio, mentre lo scopo della seconda è quello di sincronizzare il momento dell'ovulazione, garantendo un maggior rilascio di ormone luteinizzante e quindi migliorando l'ovulazione e la produzione di progesterone dal corpo luteo che si andrà a formare. La  $\text{PGF}_{2\alpha}$  ha lo scopo di eliminare il corpo luteo formatosi in seguito alla prima iniezione di GnRH, determinando un abbassamento dei tassi di progesterone. E' il metodo ad oggi più utilizzato nella specie bufalina, in quanto ha il vantaggio di risultare abbastanza economico e di semplice utilizzo. Fornisce ottimi risultati, soprattutto su animali

ciclici, consentendo di ottenere circa l'85-90% di animali in estro [Neglia et al., 2003]. La ciclicità dei soggetti è di fondamentale importanza, in quanto con le iniezioni di GnRH non si va ad incrementare la produzione di LH a livello ipofisario, ma viene semplicemente rilasciata la quantità di ormone già accumulata nell'ipofisi posteriore. La percentuale di gravidanza si attesta tra il 35 e il 40% nelle bufale adulte e tra il 45 e il 60% nelle manze.

Le bufale sono state divise in 2 gruppi sperimentali Gruppo P (n=35) e Gruppo C (n=37), omogenei per giorni di lattazione (GP  $187 \pm 73,9$  vs GC  $179 \pm 78$ ) ed ordine di parto (GP  $2,6 \pm 2,0$  vs GC  $2,9 \pm 1,9$ ).

1) Il Gruppo P ha ricevuto, al momento dell' IS, una somministrazione per via intramuscolare di 0,524 mg di Cloprostenolo sodico (Estrumate<sup>®</sup>, Schering-Plough Animal health, S.p.A.), equivalente a 0,500 mg Cloprostenolo.

2) Il Gruppo C ha ricevuto, al momento dell' IS, una somministrazione per via intramuscolare di 2 ml di soluzione fisiologica ed è stato utilizzato come gruppo controllo.

## 5.2 Indagine ecografica

A 5 ore dalla fecondazione, i soggetti sono stati sottoposti ad indagine ecografica con un ecografo portatile SonoAce Pico dotato di sonda lineare con frequenza di 10 MHz.

Pertanto ciascun ovaio è stato visualizzato per evidenziare, tramite tecnologia Eco-color-Doppler, la vascolarizzazione del follicolo ovulatorio. Successivamente è stata effettuata, tramite il pulse wave, l'analisi spettrale dei vasi del follicolo per il calcolo degli indici: peak systolic velocity (PSV cm/s), end diastolic velocity (EDV cm/s), Time average maximum velocità (TAM cm/s), median time averaged mean velocità (VMEAN cm/s) (GMEAN mmHg), (GPEAK mm Hg), (S/D), resistance index (RI) e pulsatile index (PI). Tutte le scansioni Doppler sono state effettuate in un rapporto costante di colore, di guadagno, e di velocità.

A 10 e 20 giorni dall'intervento di inseminazione strumentale, tutte le bufale sono state sottoposte a nuova indagine ecografica (SonoAce Pico con sonda lineare di 10 MHz) per valutare i diametri del corpo luteo, e mediante color doppler, la vascolarizzazione dello stesso. A tal fine è stata effettuata, tramite il pulse wave, l'analisi spettrale dei vasi del corpo luteo per il calcolo degli indici: peak systolic velocity (PSV cm/s),

end diastolic velocity (EDV cm/s), Time average maximum velocità (TAM cm/s), median time averaged mean velocità (VMEAN cm/s) (GMEAN mmHg), (GPEAK mm Hg), (S/D), resistance index (RI) e pulsatile index (PI).

Ulteriori indagini ecografiche sono state effettuate a 25 e 45 giorni dall'intervento di IS, al fine di valutare lo sviluppo e lo stato di salute dell'embrione mediante misurazione e valutazione del battito cardiaco, nonché l'incidenza della mortalità embrionale tardiva (LEM). Lo stato di gravidanza è stato infine confermato a 70 giorni dall'IS per valutare l'incidenza della mortalità fetale.

### 5.3 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata attraverso il test del chi quadro per il confronto delle percentuali di gravidanza tra i gruppi a 25, 45 e 70 giorni.

Il confronto tra i valori di vascolarizzazione rilevati mediante ecodoppler sul follicolo ovulatorio e corpo luteo a 10 e 20 giorni è stato analizzato mediante il test t di Student a due code.

### 5.4 Risultati

Nel presente esperimento è emerso che la fertilità a 25 giorni dall'IS è stata del 43,05% (31/72). Tale valore si è ridotto all'esame ecografico effettuato a 45 giorni al 37,5% (27/72). La riduzione della percentuale di soggetti gravidi è senz'altro da attribuire al fenomeno della mortalità embrionale tardiva che ha interessato il 12,9% (4/31) delle bufale diagnosticate gravide a 25 giorni dall'IS.

Non sono emerse, differenze statisticamente significative tra gli stadi riproduttivi considerati a 25 gg. post inseminazione (gravide vs vuote) e a 45 gg. post inseminazione (gravide, vuote e LEM) circa le dimensioni (lunghezza e larghezza) medie dei follicoli ovulatori registrati il giorno della fecondazione (**Tabella 1**).

**Tabella 1.** Dimensioni del follicolo ovulatorio (lunghezza e larghezza in cm) registrate dopo 5 ore dall'intervento di IS in bufale non gravide (NG), gravide (G) e che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM).

<b>Giorno dall'IS</b>		<b>NG (n)</b>	<b>G (n)</b>	<b>LEM (n)</b>
<b>25</b>	Lunghezza	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,3	–
		(41)	(31)	–
	Larghezza	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2	–
		(41)	(31)	–
<b>45</b>	Lunghezza	1,5 ± 0,4	1,6 ± 0,3	1,7 ± 0,3
		(41)	(27)	(4)
	Larghezza	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1
		(41)	(27)	(4)

Dall'analisi dei parametri rilevati sui corpi lutei è emerso che gli stessi a 10 giorni presentavano una larghezza media maggiore nei soggetti vuoti rispetto ai gravidi sia a 25 ( $P < 0,05$ ) che a 45 ( $P = 0,07$ ) giorni (**Tabella 2**) dall'IS.

**Tabella 2.** Dimensioni del corpo luteo (lunghezza e larghezza in cm) al giorno 10 dall'intervento di IS in bufale non gravide (NG), gravide (G) e che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM).

<b>Giorno dall'IS</b>		<b>NG (n)</b>	<b>G (n)</b>	<b>LEM (n)</b>
<b>25</b>	Lunghezza	2,01 ± 0,55 (41)	1,99 ± 0,29 (31)	–
	Larghezza	1,61 ± 0,47 <sup>a</sup> (41)	1,41 ± 0,18 <sup>b</sup> (31)	–
<b>45</b>	Lunghezza	2,01 ± 0,55 (41)	2,02 ± 0,30 (27)	1,83 ± 0,16 (4)
	Larghezza	1,61 ± 0,47 <sup>x</sup> (41)	1,43 ± 0,18 <sup>xx</sup> (27)	1,30 ± 0,13 (4)
<b>a ≠ b p &lt; 0,05 x ≠ xx p = 0,07</b>				

Tale tendenza si inverte al 20mo giorno dall'IS (**Tabella 3**).

**Tabella 3.** Dimensioni del corpo luteo (lunghezza e larghezza in cm) al giorno 20 dall'intervento di IS in bufale non gravide (NG), gravide (G) e che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM).

<b>Giorno dall'IS</b>		<b>NG (n)</b>	<b>G (n)</b>	<b>LEM (n)</b>
<b>25</b>	Lunghezza	1,9 ± 0,3 (41)	2,1 ± 0,3 (31)	–
	Larghezza	1,5 ± 0,2* (41)	1,6 ± 0,2** (31)	–
<b>45</b>	Lunghezza	1,9 ± 0,3 (41)	2,1 ± 0,4 (31)	2,0 ± 0,1 (4)
	Larghezza	1,5 ± 0,2 (41)	1,6 ± 0,3 (31)	1,6 ± 0,2 (4)
<b>* ≠ ** p = 0,09</b>				

Dall'analisi del flusso ematico del follicolo ovulatorio, registrata al giorno dell'inseminazione, sono stati rilevati dei valori medi di TAM pari a  $4,7 \pm 2,0$ . In particolare, è emerso che il follicolo preovulatorio delle bufale gravide a 25 e 45 giorni ha fatto registrare valori più elevati che hanno raggiunto la significatività statistica esclusivamente con i soggetti non gravidi (**Tabella 4**).

**Tabella 4.** TAM rilevato sul follicolo ovulatorio 5 ore dopo l'intervento di IS in bufale non gravide (NG), gravide (G) e che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM).

<b>Giorno dall'IS</b>		<b>NG (n)</b>	<b>G (n)</b>	<b>LEM (n)</b>
<b>25</b>	TAM	$4,2 \pm 2,2^*$ (41)	$5,1 \pm 1,6^{**}$ (31)	-
<b>45</b>	TAM	$4,2 \pm 2,2^x$ (41)	$5,3 \pm 1,7^{xx}$ (27)	$4,3 \pm 0,6$ (4)

\*  $\neq^{**}$   $p=0,09$  ;  $x \neq^{xx}$   $p=0,07$

Una migliore vascolarizzazione, testimoniata da valori di TAM più elevati, è stata registrata anche per il corpo luteo a 10 giorni (**Tabella 5**). Dall'analisi della tabella 5 si evidenziano, infatti, valori di TAM medi maggiori nei soggetti gravidi rispetto ai vuoti ( $p=0,09$ ) e ai LEM ( $p<0,05$ ).

**Tabella 5.** TAM rilevato sul corpo luteo al giorno 10 dall'IS in bufale non gravide (NG), gravide (G) e che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM).

<b>Giorno dall'IS</b>		<b>NG (n)</b>	<b>G (n)</b>	<b>LEM (n)</b>
<b>25</b>	TAM	$7,7 \pm 3,7$ (41)	$8,9 \pm 3,8$ (31)	-
<b>45</b>	TAM	$7,7 \pm 3,7^*$ (41)	$9,5 \pm 3,7^{**a}$ (27)	$5,5 \pm 2,3^b$ (4)

**\*  $\neq$ \*\*\*  $p=0,09$  ;  $a \neq b$   $p<0,05$**

Non sono emerse differenze statisticamente significative per questo parametro rilevato sul Corpo luteo a 20 giorni post IS (**Tabella 6**).

**Tabella 6.** TAM rilevato sul corpo luteo al giorno 20 dall'IS in bufale non gravide (NG), gravide (G) e che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM).

<b>Giorno dall'IS</b>		<b>NG (n)</b>	<b>G (n)</b>	<b>LEM (n)</b>
<b>25</b>	TAM	10,8 ± 4,2 (41)	10,0 ± 3,0 (31)	-
<b>45</b>	TAM	10,8 ± 4,2 (41)	10,3 ± 3,0 (27)	8,3 ± 2,9 (4)

\* ≠\*\* p=0,09 ; a≠b p<0,05

Non sono emerse differenze tra le bufale del gruppo controllo e quelle che hanno ricevuto la somministrazione di PGF2 $\alpha$  al momento dell'IS per la fertilità (**Tabella 7**) e per i parametri vascolari rilevati sul follicolo ovulatorio e sul corpo luteo.

<b>Gruppo</b>	<b>25 gg post-IS</b>			<b>45 gg post-IS</b>	
	<b>Gravide</b>	<b>Vuote</b>	<b>Totale</b>	<b>Gravide</b>	<b>LEM</b>
<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>	<b>(n)</b>
<b>Gruppo C</b>	45,95%	54,05%	100%	40,54%	13,3%
(37)	(17/37)	(20/37)	(37/37)	(15/37)	(2/15)
<b>Gruppo P</b>	40%	60%	100%	34,28%	14,28%
(35)	(14/35)	(21/35)	(35/35)	(12/35)	(2/14)
<b>Totale</b>	43,05%	56,94%	100%	37,5%	12,9%
(72)	(31/72)	(41/72)	(72/72)	(27/72)	(4/31)
<b>a <math>\neq</math> b p &lt; 0,05 A <math>\neq</math> B p &lt; 0,01</b>					

**Tabella 7.** Percentuali di soggetti gravidi, vuoti e con mortalità embrionale tardiva (LEM) al 25mo e 45mo giorno post IS nei gruppi C e P.

## 5.5 Discussione

L'incidenza della mortalità embrionale tardiva (LEM) riscontrata in questo esperimento è stata di gran lunga inferiore a quella rilevata in precedenti studi effettuati durante il periodo in cui il numero di ore di luce inizia ad accrescersi [**Campanile et al., 2005; Vecchio et al. 2010**]. Anche la fertilità riscontrata a 25 e 45 giorni è risultata piuttosto bassa. In un precedente lavoro [**Campanile et Neglia, 2007**] era emerso che ad una bassa fertilità a 25 giorni corrispondeva una bassa incidenza del fenomeno della mortalità embrionale non modificabile da interventi farmacologici effettuati a 25 giorni dall'IS. In questo esperimento è stato evidenziato, infatti, che il trattamento con prostaglandina al momento dell'intervento fecondativo non ha modificato la fertilità. In questi casi è ipotizzabile che i fattori che agiscono sul successo della fertilità della specie agirebbero ad altri livelli impedendo la fertilizzazione della cellula uovo e di conseguenza l'avvio della gestazione. L'adozione di protocolli terapeutici precoci e/o tardivi utili a favorire il mantenimento della gravidanza ed evitare il fenomeno della mortalità embrionale non avrebbe alcun effetto. Inoltre, va sottolineato che le dimensioni del corpo luteo sono risultate maggiori nei soggetti vuoti e ciò probabilmente è da attribuire alle accennate cause di perdita di fertilità. E' probabile che una bassa quantità di estrogeni prodotti dal follicolo ovulatorio abbia

ritardato il picco di LH e di conseguenza si sarebbe verificato un aumento delle dimensioni del follicolo e l'ovulazione di un oocita probabilmente non idoneo a dar luogo ad una gravidanza. E' noto che le dimensioni del corpo luteo, spesse volte, sono correlate alle dimensioni del follicolo ovulatorio. La tendenza si è invertita a 20 giorni in quanto a quest'epoca è iniziato il fenomeno della regressione del corpo luteo nei soggetti vuoti.

Una migliore vascolarizzazione del follicolo preovulatorio e del corpo luteo favorisce l'insorgenza e il mantenimento della gestazione. Nel presente lavoro sono stati registrati valori più elevati del TAM sia nel follicolo che nel corpo luteo di 10 giorni nei soggetti gravidi a 25 e 45 giorni. In un precedente lavoro era stato evidenziato che un maggior flusso ematico del corpo luteo a 10 giorni migliorava la fertilità in bufale sottoposte a sincronizzazione dell'ovulazione e IS [Russo et al., 2010]. Un miglior flusso favorisce, infatti, una migliore attività secretiva del corpo luteo che si traduce in una maggiore secrezione di progesterone [Russo et al., 2010]. Nel presente esperimento, la migliore vascolarizzazione del follicolo preovulatorio, registrata nei soggetti gravidi, avrebbe favorito una miglior risposta al protocollo di sincronizzazione e al picco indotto di LH.

Nel bovino **Acosta et al. (2003)** descrive un aumento del TAM nella parete del follicolo preovulatorio sincrono con il flusso di sangue durante l'aumento plasmatico della concentrazione di LH nei soggetti con ovulazione indotta mediante GnRH. I risultati dello studio di **Acosta et al. (2003)** forniscono una prima prova visibile del cambiamento temporaneo del flusso sanguigno all'interno della parete follicolare di bovine con ovulazione indotta da GnRH. Le immagini del follicolo preovulatorio rivelano che l'area del flusso del sangue e il TAM sono temporalmente associate con l'aumento della concentrazione plasmatica dell'estradiolo e con il picco di LH. Il risultato indica una correlazione funzionale tra il flusso del sangue nella parete follicolare e la concentrazione plasmatica di estradiolo e di LH nella fase preovulatoria delle bovine. Il primo rilevabile aumento della concentrazione dell'estradiolo plasmatico coincide con la vascolarizzazione (presenza flusso di sangue nell'area del follicolo dominante) della parete follicolare. Questi risultati concordano con studi precedenti nei quali è stato dimostrato che il diametro follicolare, la concentrazione di estrogeni nel fluido follicolare e l'area vascolare sono parametri strettamente associati [**Mattioli et al., 2001**].

## **6. Esperimento 2: Influenza della stagione sulla funzionalità del corpo luteo e riflessi sull'efficienza dell'inseminazione strumentale nella specie bufalina**

### **6.1 Materiali e metodi**

La prova è stata condotta tra Ottobre e Dicembre (autunno) e Gennaio e Marzo (periodo di transizione) rispettivamente su un numero di 104 e di 118 pluripare di Bufala Mediterranea Italiana allevate nel Sud Italia (latitudine compresa tra 40.5° N e 41.5°N). La distanza media dal parto dei due gruppi era rispettivamente di  $150 \pm 63$  e  $152 \pm 82$  giorni. Le bufale erano allevate su paddoks in cemento con uno spazio disponibile pari a 15 m<sup>2</sup> per ciascuna bufala. I soggetti ricevevano una dieta somministrata con tecnica *Unifeed* caratterizzata da una densità energetica di 0,90 UFL/kg di sostanza secca, una concentrazione in proteine grezze del 15% e una percentuale di foraggi del 50-55%.

La scelta delle bufale da utilizzare per l'espletamento del presente esperimento è stata effettuata tenendo conto dello stato di ciclicità e dell'assenza di eventuali anomalie a carico dell'apparato genitale. In definitiva, tutti i soggetti selezionati venivano sottoposti a visita ginecologica mediante esplorazione rettale per valutare la presenza o assenza, a livello delle ovaie, di follicoli  $\geq 1$  cm e/o corpi lutei e

l'assenza di patologie uterine. Le bufale scelte sono state successivamente sottoposte a sincronizzazione dell'ovulazione e inseminazione strumentale (IS) a tempo fisso utilizzando l'Ovynch-Tai Program [Neglia et al., 2003]. Il protocollo utilizzato per sincronizzare l'ovulazione è stato simile a quello sviluppato da Pursley et al. (1995) per la bovina e adattato da Neglia et al. (2003) nella bufala. Esso consiste nel somministrare, al giorno 0, 12 µg di buserelin acetato (Receptal<sup>®</sup>, Intervet), 15 mg di luprostiol (Prosolvin<sup>®</sup>, Intervet) al giorno 7 e ripetere i 12 µg di buserelin acetato al giorno 9. L'inseminazione strumentale è stata effettuata dopo 16 e 40 ore dalla somministrazione dell'ultima dose di buserelin acetato.

Per verificare lo stato di gestazione e l'eventuale incidenza di mortalità embrionale tardiva, tutte le bufale inseminate sono state sottoposte ad indagine ecografica a 25 e a 45 giorni dall'intervento di IS. Sono stati, inoltre, prelevati campioni di sangue a 10, 20 e 25 giorni dopo l'intervento di inseminazione strumentale per il dosaggio del progesterone mediante metodica RIA. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 2000 rpm per 15 minuti. Successivamente il plasma è stato separato e stoccato a -18 °C fino al momento delle analisi.

## **6.2 Analisi statistica**

Le differenze nella concentrazione del progesterone dosato nel plasma nei giorni 10, 20 e 25 dopo l'inseminazione strumentale nelle bufale risultate gravide, non gravide e in quelle che hanno presentato mortalità embrionale tardiva e tra le due differenti stagioni sono state testate con l'ANOVA per misure ripetute (SAS\ISTAT, 2000).

Le differenze relative all'incidenza di soggetti gravidi, non gravidi e quelli che hanno presentato mortalità embrionale tardiva sono state valutate mediante il test del Chi quadrato.

### 6.3 Risultati

L'incidenza di soggetti gravidi a 25 giorni non risulta statisticamente significativa tra le bufale inseminate nel periodo autunnale e nel periodo di transizione. La differenza all'indagine ecografica condotta a 25 giorni dall'intervento di IS risulta essere di solo 7 punti percentuali (**Tabella 8**).

**Tabella 8:** Fertilità e incidenza della mortalità embrionale tardiva (LEM) in bufale sottoposte ad IS in due differenti stagioni.

	Transizione		Autunno	
	n	%	n	%
<b>Gravide 25 giorni</b>	52	44,1	53	51
<b>Gravide 45 giorni</b>	38	32,2 a	47	45,2 b
<b>Vuote</b>	66	55,9 a	51	49,0 b
<b>LEM</b>	14	26,9 a	6	11,3 b

**a , b = P < 0,05**

L'elevata perdita embrionale ( $P < 0,05$ ) registrata nei soggetti inseminati nel periodo in cui aumenta il numero di ore di luce giornaliera (periodo di transizione) ha ridotto notevolmente la fertilità facendola scendere dal 44,1% al 32,2% e incrementando le differenze ( $P < 0,05$ ) tra le stagioni (**Tabella 8**).

L'andamento del progesterone ematico riflette in generale l'andamento dei fenomeni riproduttivi descritti. Infatti i livelli di progesterone, dosati nei soggetti gravidi e in quelli vuoti a 45 giorni, risultano significativamente più bassi ( $P < 0,01$ ) nelle bufale inseminate nel periodo di transizione, mentre tale andamento è riscontrabile solo al giorno 10 dall'IS nelle bufale che hanno presentato mortalità embrionale tardiva (Tabella 9).

**Tabella 9:** Livelli ematici di progesterone a 10, 20 e 25 giorni dall' IS in bufale gravide, vuote e con mortalità embrionale tardiva (LEM) riscontrati in due differenti stagioni.

	<b>Gravide</b>	<b>Vuote</b>	<b>LEM</b>
	m ± es	m ± es	m ± es
	<b>10 Giorni</b>		
<b>Transizione</b>	2,1 ± 0,1 Ax	1,4 ± 0,1 Bb	2,1 ± 0,2 ax
<b>Autunno</b>	4,4 ± 0,2 Ay	3,2 ± 0,1 Bb	4,4 ± 1,0 ay
	<b>20 Giorni</b>		
<b>Transizione</b>	2,8 ± 0,1 Ax	1,8 ± 0,2 Bx	3,4 ± 0,5 A
<b>Autunno</b>	4,5 ± 0,1 Ay	2,4 ± 0,1 By	3,2 ± 0,7 b
	<b>25 Giorni</b>		
<b>Transizione</b>	3,4 ± 0,1 Ax	1,4 ± 0,2 Bx	2,8 ± 0,3 A
<b>Autunno</b>	4,7 ± 0,1 Ay	2,3 ± 0,1 By	2,7 ± 0,5 B

**A, B e a, b = differenze per  $P < 0,01$  (maiuscole) e  $P < 0,05$  (minuscole) tra righe;**

**x, y = differenze per  $P < 0,01$  tra colonne.**

E' interessante notare che pur con livelli di progesterone diversi gli andamenti risultano simili nelle classi riproduttive (gravide, vuote e LEM) e nei tempi considerati. L'incidenza di calori anomali, registrata nei soggetti non gravidi, risulta statisticamente più elevata ( $P < 0,0001$ ) nella stagione in cui aumenta il numero di ore di luce giornaliera (periodo di transizione). In particolare, mentre nel periodo autunnale l'incidenza di soggetti aciclici (A) e con luteinizzazione tardiva (LT) è complessivamente del 4% (2% A e 2% LT), nel periodo di transizione si osserva il 29% di A, il 27% di LT ed il 15,6% di soggetti con fase luteinica breve.

## 6.4 Discussione

Questo esperimento è stato effettuato per confrontare l'efficacia della inseminazione strumentale nella bufala mediterranea italiana in due periodi dell'anno, caratterizzati da diversa durata delle ore di luce. Alle latitudini italiane, il bufalo si comporta come una specie a fotoperiodo negativo e le femmine mostrano una diminuzione dell'attività riproduttiva da metà inverno fino alla primavera in risposta alla crescente lunghezza del giorno [Zicarelli, 1997]. La stagionalità riproduttiva può essere una delle principali cause di scarsa fertilità nelle bufale: pubertà ritardata, estro silente e lunga inattività ovarica nel postpartum [Singh, 1988; Singla et al., 1996] risultano principalmente influenzate dalla durata di luce giornaliera. Nella bufala, una ridotta attività del corpo luteo (CL) è stata osservata durante il periodo di luce crescente [Campanile et al., 1992]. Questa condizione non provoca sempre inattività ovarica: l'estro può essere seguito dall'ovulazione, ma a questa, può far seguito una fase luteinica inadeguata [Zicarelli, 1992]. Infatti, è stata dimostrata una funzionalità inferiore del CL durante un periodo di luce giornaliera crescente [Campanile et al., 2005; 2007b].

E' stato dimostrato [Garrett et al., 1988; Mann et Lamming, 1999; 2001] che, come nelle bovine e nelle pecore, anche nella specie bufalina

la mortalità embrionale (EM) è dovuta principalmente ad una ridotta secrezione di progesterone (P4) da parte del CL [**Campanile et Neglia, 2007**].

La maggior parte di questi problemi derivano dall'utilizzo della tecnica di destagionalizzazione dei parti [**Zicarelli, 1997; Gasparrini, 2002**]. Infatti, in Italia, Brasile, Venezuela e Argentina è stato rilevato un periodo di interparto inferiore a 400 giorni ed un tasso di rimonta inferiore al 12%, quando le bufale sono allevate rispettando la loro stagionalità naturale e senza un accoppiamento controllato [**Zicarelli et al., 1992**]. Purtroppo, nel nostro paese, la stagionalità riproduttiva della bufala ha forti implicazioni economiche: il picco annuale della richiesta di latte da parte del mercato corrisponde al periodo primaverile-estivo, non favorevole all'attività riproduttiva del bufalo. Per superare questo problema è stata ampiamente impiegata la tecnica di destagionalizzazione (OBSM). Quando questa tecnica è stata applicata per brevi periodi è stata osservata una riduzione della fertilità (30% vs 15%) rispetto alle aziende agricole in cui è stata adottata per periodi più lunghi [**Campanile, 1997**]. Questo perché nel corso degli anni sono state selezionate le bufale meno sensibili agli effetti del fotoperiodo; tuttavia, una perdita di fertilità si registra ancora.

Nella specie bufalina la mortalità embrionale è considerata una delle principali cause di perdita di fertilità, soprattutto negli animali che non si accoppiano durante il loro periodo riproduttivo.

I risultati ottenuti nel nostro studio dimostrano che alle nostre latitudini l'efficienza dell'inseminazione strumentale, stimata come percentuale di gravidanza dopo il 45mo giorno dalla IS, è notevolmente migliorata durante i mesi con diminuzione delle ore di luce giornaliera (autunno) rispetto al periodo di transizione (45,2 % vs 35,2 rispettivamente). Poiché non sono state riscontrate differenze durante la gravidanza a 25 giorni tra i due periodi, la perdita di fertilità registrata nel periodo di transizione è legata principalmente alla maggiore incidenza di LEM (11,3% vs 26,9% nel periodo di transizione). Questo è un esempio eclatante ed atteso della stagionalità delle specie ed è in accordo con altri studi eseguiti a diverse latitudini e con tipologie di gestione e condizioni di allevamento diverse. Infatti, la percentuale di mortalità embrionale che abbiamo trovato nel periodo di transizione rientra nel range precedentemente riportato (20-40%) per la bufala Mediterranea Italiana fecondata con IS durante le stagioni caratterizzate da elevato numero di ore di luce [Campanile et al., 2005; 2007a; 2007b]. D'altra parte, il tasso di mortalità embrionale osservato in autunno nel presente studio è simile a quello (circa il 7%) registrato in Brasile nei giorni in cui si

avverte una diminuzione della luce giornaliera [**Baruselli et al., 1997**]. Sempre in Brasile un tasso di mortalità embrionale del 20% è stato riscontrato in bufale vicino all'equatore da **Vale et al. (1989)**; è opportuno sottolineare che a queste latitudini altri fattori, come la disponibilità di foraggio e la pioggia, piuttosto che il rapporto luce/buio influenzano l'attività riproduttiva della bufala. L'importanza del nostro studio consiste nell'aver confrontato l'efficienza della IS in periodi di crescente e decrescente durata della luce giornaliera nell'arco dello stesso anno ed alle stesse latitudini. Infatti, studi di diversi autori effettuati in paesi diversi non possono essere facilmente confrontati a causa della moltitudine di fattori che possono essere implicati, come ad esempio i sistemi di gestione, l'alimentazione e le tecniche di allevamento.

Il tasso di LEM registrato durante il periodo di transizione è paragonabile a quello (20%) registrato, alle latitudini italiane, nelle bufale sottoposte ad inseminazione naturale durante i giorni a luce crescente [**Vecchio et al., 2007**].

Il tasso di concepimento osservato nel nostro studio è stato molto superiore a quello (35%) che è stato recentemente riportato da **Oropeza et al. (2010)** in Venezuela, in bufale di razza Murrah allevate con un sistema semi-intensivo durante la stagione riproduttiva (Novembre-

Gennaio) in seguito a FTAI. Inoltre, i tassi di concepimento descritti nel nostro studio, in entrambi i periodi, sono stati anche superiori a quelli trovati dagli autori indiani dopo l'IS su estro spontaneo; questi autori riportano un tasso di concepimento che va dal 16,6% al 33,3% in relazione alla fase dell'estro, con i risultati migliori quando le manze sono state inseminate a 18-24 ore dopo l'estro [**Kumaresan et Ansari, 2001**].

In questa prova è stata, inoltre, dimostrata la sensibilità al fotoperiodo della specie che causa un'alterazione del ciclo e della funzionalità del corpo luteo. Nel periodo di transizione, è stata, infatti, registrata una maggiore incidenza di bufale acicliche e di calori anomali nei soggetti sincronizzati, sottoposti ad IS e risultati vuoti all'indagine ecografica effettuata a 25 e a 45 giorni. In questo stesso periodo livelli di progesterone ematico, dosati in tutte le categorie riproduttive considerate (gravide, non gravide e LEM), significativamente più bassi, testimoniano la minore funzionalità del corpo luteo (CL). È stato osservato che l'attività del CL è influenzata principalmente dalla stagione del parto [**Zicarelli, 1994a**] e dipende dalla durata della luce diurna. Infatti, ciò influisce sull'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi con conseguenze sull'attività ovarica [**Kaker et al., 1980**]. Durante il periodo di transizione, che corrisponde al pieno inverno in Italia, l'incidenza di

riduzione dell'attività del CL nella bufala si attesta tra il 5% e il 50% **[Campanile et al., 1992]**.

Tra le cause di LEM, l'inadeguata funzionalità del CL e quindi la ridotta concentrazione di P4 nel periodo preimpianto favorisce la perdita embrionale. L'alterata secrezione del P4 è stata collegata con una ridotta capacità dell'embrione in via di sviluppo a secernere Interferon-tau (IFN- $\tau$ ) a livelli necessari per prevenire la luteolisi **[Wathes et al., 1998]**.

Tuttavia, vale la pena sottolineare che, nonostante siano stati descritti nella bufala una mortalità embrionale precoce e una mortalità fetale, la maggiore incidenza di EM si manifesta più tardi rispetto ai bovini, tra il 25mo ed il 40mo giorno **[Campanile et Neglia, 2007]**, e questo ci fa escludere che ci sia un problema di riconoscimento materno-fetale. In effetti, questo riconoscimento tra madre e feto è dovuto alla produzione da parte dell'embrione di quantità adeguate di IFN- $\tau$  che blocca la luteolisi che altrimenti si verificherebbe intorno al 16mo-18mo giorno, in assenza di segnali, in modo che il ciclo possa ricominciare. Inoltre, poiché nella bufala la fase di impianto si conclude intorno al 30mo giorno, questa EM tardiva si verifica quando la placenta si sta sviluppando.

Comunque, la riduzione della concentrazione del P4 che è stata trovata all'incirca nel 50% delle bufale che hanno mostrato LEM, suggerisce la presenza concomitante di altri fattori. Pertanto, la LEM nella specie bufalina è un fenomeno complesso, non ancora del tutto compreso, e presenta una eziologia multifattoriale. E' noto che la qualità dei gameti influenza il successo dell'inseminazione e il proseguimento della gravidanza. Pertanto, al fine di spiegare circa il 50% di EM non imputabile alla ridotta secrezione di P4, abbiamo ipotizzato che la stagione possa influenzare anche la competenza dello sviluppo dell'ovocita. Nella nostra indagine è interessante notare che l'abbassamento della progesteronemia tra il 10mo e il 20mo giorno si verifica soltanto nelle bufale inseminate in autunno, mentre nel periodo di transizione tale abbassamento non avviene ed è pertanto ipotizzabile, anche in funzione della minore concentrazione di progesterone, che l'alterazione sia avvenuta nella fase iniziale dell'embriogenesi e che, ancora una volta, si dimostra che la LEM nella bufala è correlata agli effetti della luce sul quadro riproduttivo.

## **7. Esperimento 3: Effetto del trattamento tardivo con GnRH, hCG e progesterone sulla fertilità della bufala**

### **7.1 Materiali e metodi**

#### **Animali**

Lo studio è stato condotto tra Gennaio e Marzo su 385 bufale pluripare di razza Mediterranea Italiana ad una distanza dal parto di  $152 \pm 59$  giorni allevate in Italia meridionale (tra il  $40,5^\circ$  e il  $41,5^\circ$  parallelo N), stabulate su paddocks in cemento con una disponibilità di spazio di circa  $15 \text{ m}^2/\text{capo}$ . I piani alimentari adottati prevedevano una razione con le seguenti caratteristiche: 50-55% di foraggi e 45-50% di concentrati, una densità energetica di  $0,90 \text{ UFL/Kg}$  di S.S. e 15% di proteine grezze/S.S. Gli animali, utilizzati per l'espletamento di questo esperimento, sono stati scelti attraverso un esame clinico (esplorazione rettale) per stabilire lo stato di ciclicità e l'assenza di patologie a carico della sfera genitale. Dei soggetti sottoposti a visita clinica dell'apparato riproduttivo, solo quelli con un corpo luteo e/o con un follicolo di dimensioni superiori ad 1 cm e con assenza di patologie clinicamente apprezzabili dell'apparato genitale sono stati selezionati per la sincronizzazione dell'estro e quindi per l'IS.

## **Sincronizzazione dell'estro e IS**

I soggetti sono stati sincronizzati mediante protocollo Ovsynch-Tai [Pursley et al., 1995; Neglia et al., 2003]. Il protocollo prevede la somministrazione di agonisti del GnRH (buserelin acetato 12 µg; Receptal<sup>®</sup>, Intervet, Milano, Italia) al giorno 0, al giorno 7 di un analogo di PGF<sub>2α</sub> (luprostiol, 15 mg; Prosolvin<sup>®</sup>, Intervet) e nuovamente al giorno 9 somministrazione di GnRH agonista (12 µg). L'IS è stata effettuata dallo stesso operatore ed ogni animale è stato inseminato, a 16 e 40 h dalla seconda iniezione dell'agonista del GnRH.

## **Diagnosi di gravidanza**

A 25 giorni dall'intervento di inseminazione strumentale è stato effettuato l'esame ecografico per verificare lo stato di gestazione e lo sviluppo embrionale. L'ecografia è stata effettuata con ecografo Aloka SSD-500 con una sonda lineare di 7,5 MHz (Aloka CO., Tokyo, Japan) sempre dallo stesso operatore.

La diagnosi di gravidanza è stata confermata a 45 gg. mediante ecografia e a 70gg. mediante esplorazione rettale. Le bufale gravide a 25 gg. ma non a 45gg. sono state considerate come soggetti con mortalità embrionale tardiva (LEM), mentre le bufale gravide a 45gg. ma non a 70 gg. sono state considerate come soggetti con una mortalità fetale (FM).

## Trattamenti e dosaggio del progesterone

Al 25mo giorno dalla prima inseminazione, le bufale gravide (n=204) sono state divise in gruppi omogenei considerando l'ordine di parto e la distanza dal parto ed ogni gruppo è stato destinato a differenti trattamenti:

1. GnRH agonista (n=52) somministrazione di 12 µg di buserelin acetato (Receptal<sup>®</sup>, Intervet) intramuscolo (im).
2. hCG (n=51) 1500 U.I. di gonadotropina corionica umana (hCG; Chorulon<sup>®</sup>; Intervet) im.
3. Progesterone (n=47) 341 mg di P4 im ogni 4 giorni per 3 volte.
4. Controllo (n=54) trattamento con soluzione fisiologica (0,9% di NaCl) im.

A 10, 20 e 25 giorni dall'inseminazione strumentale si è provveduto a prelevare, da tutte le bufale inseminate, un campione di latte che è stato stoccato fino al momento delle analisi. La determinazione del progesterone è stata effettuata con metodica RIA su siero di latte come descritto da **Prandi et al. (1992, 1994)** e modificata da **Campanile et al. (2007a)**.

## 7.2 Analisi statistica

Le differenze di concentrazione di P<sub>4</sub> nel siero di latte ai giorni 10, 20 e 25 dall'I.S. tra le gravide, non gravide e le bufale che hanno avuto LEM o FM sono state analizzate con l'ANOVA per misure ripetute (SPSS 12.0, 2005). Il confronto fra soggetti gravidi e soggetti con LEM o FM tra i trattamenti è stato effettuato mediante il test del  $\chi^2$  (SPSS 12.0, 2005).

## 7.3 Risultati

Delle 385 bufale inseminate, a 25 giorni sono risultate gravide il 52,9% (204/385) tale incidenza si è ridotta al 41,8% (161/385) alla diagnosi ecografica effettuata al 45mo giorno. Nel periodo compreso tra il 25mo e il 45mo giorno dall'I.S. è stata registrata una LEM media del 21% (43/204), che è risultata notevolmente più elevata nei soggetti che non hanno avuto alcun trattamento (38,9%). I trattamenti con agonista del GnRH, hCG e P4 al 25mo giorno post IS hanno, infatti, incrementato ( $P<0,01$ ) la percentuale di animali gravidi (**Tabella 10**).

**Tabella 10:** Tasso di gravidanza a 25, 45 e 70 giorni dopo l'inseminazione in bufale trattate con GnRH, hCG, Progesterone e soluzione salina al giorno 25, e l'incidenza della mortalità embrionale (EM) (tra i giorni 25 e 45) e mortalità fetale (FM), (tra i giorni 45 e 70).

Gruppo	25 Giorni (n)	% Gravidanza		EM	FM
		45 Giorni (n)	70 Giorni (n)	25-45 Giorni (n)	45-70 Giorni (n)
<b>GnRH</b>	52	84,6 <sup>A</sup> (44)	93,2 <sup>A</sup> (41)	15,4 <sup>A</sup> (8)	6,8 <sup>A</sup> (3)
<b>hCG</b>	51	86,3 <sup>A</sup> (44)	90,9 <sup>A</sup> (40)	13,7 <sup>A</sup> (7)	9,1 <sup>A</sup> (4)
<b>P4</b>	47	85,1 <sup>A</sup> (40)	92,5 <sup>A</sup> (37)	14,9 <sup>A</sup> (7)	7,5 <sup>A</sup> (3)
<b>Controllo</b>	54	61,1 <sup>B</sup> (33)	90,9 <sup>A</sup> (30)	38,9 <sup>B</sup> (21)	9,1 <sup>A</sup> (3)
<b>Totale</b>	204	78,9 (161)	91,9 (148)	21,1 (43)	8,1 (13)

**a ≠ b p < 0,05**

**A ≠ B p < 0,01**

La percentuale di animali con camera gestazionale a 45 giorni è stata più bassa nel gruppo controllo, rispetto al gruppo GnRH, hCG e del gruppo trattato con P4.

Se considerassimo solo gli animali che presentano un decremento dei valori di P4 ( $p < 0,05$ ) tra il giorno 20 ( $284 \pm 39$ ) e il giorno 25 ( $202 \pm 28$ ) dall'inseminazione tutti i trattamenti non avrebbero effetto sulla

riduzione della mortalità embrionale. Infatti il 100% (22/22) di questi animali trattati con GnRH, hCG e P4 hanno mostrato mortalità embrionale tra il 25mo e il 45mo giorno.

La mortalità embrionale tra il 45mo e il 70mo giorno dalla fecondazione è stata dell'8,1% (13/161).

Delle 181 bufale non gravide, il 53,6% (97/181) ha presentato manifestazioni estrali con elevati livelli di P4 a 10 giorni dall'IS e una riduzione a 20 giorni. In 32/181 (17,7%) bufale i livelli di P4 sono stati elevati (>150 pg/ml) solo al giorno 20. Infine 11/181 non hanno mostrato valori di P4 elevati né al giorno 10 né al giorno 20 e quindi sono considerate acicliche. Il 22,6% (n=41) degli animali non gravidi ha avuto elevati livelli di P4 sia al giorno 10 che al giorno 20, ed è interessante notare che il 15,5% (28/181) dei soggetti, ha mostrato alti livelli di P4 nei giorni 10, 20 e 25.

In **Tabella 11** vengono riportate le concentrazioni di P4 nel siero di latte dei soggetti gravidi, non gravidi e di quelli che hanno mostrato LEM.

**Tabella 11:** Concentrazione di progesterone (pg/ml) nel siero di latte in bufale gravide (G), non gravide (NG) e in bufale che hanno mostrato mortalità embrionale tardiva (LEM) al giorno 10, 20 e 25 dopo l'AI. I risultati sono stati presentati come media  $\pm$  ES.

		Giorni dopo l' IA		
	(n)	10	20	25
<b>G</b>	(161)	282,4 $\pm$ 10,2a	299,6 $\pm$ 9,8A	367,6 $\pm$ 15A
<b>NG</b>	(181)	243,6 $\pm$ 29,1b	195,3 $\pm$ 10,6B	234,9 $\pm$ 14.3B
<b>LEM</b>	(43)	291,5 $\pm$ 26,5ab	227,4 $\pm$ 23,1B	214 $\pm$ 20B

**a  $\neq$  b p < 0,05      A  $\neq$  B p < 0,01**

I livelli di progesterone dosati nel siero di latte sono risultati statisticamente più elevati ( $P < 0,05$ ) nei soggetti diagnosticati gravidi a 45 giorni rispetto alle bufale non gravide. Tale differenza ( $P < 0,01$ ) si è evidenziata successivamente, a 20 e 25 giorni, anche nelle bufale che hanno presentato mortalità embrionale tardiva (**Tabella 11**).

Non sono state evidenziate, invece, differenze nei livelli di P4 nel siero nei giorni 10, 20 e 25 dalla fecondazione tra le bufale che hanno avuto mortalità fetale e le bufale gravide a 70 giorni.

## 7.4 Discussione

L'importanza della concentrazione di P4 durante le prime settimane di gravidanza per ridurre la LEM è stata dimostrata nella bufala [Vale et al., 1989; Campanile et al., 2008, 2008a; Neglia et al., 2008].

Le analisi della concentrazione di P4 hanno mostrato che negli animali gravidi ci sono livelli di P4 più alti a 20 e 25 gg. dall'inseminazione rispetto alle bufale non gravide e a quelle che hanno mostrato LEM, confermando l'importanza di questo ormone nel mantenimento della gravidanza.

Come descritto, alcuni soggetti non gravidi hanno mostrato alti livelli di P4 nel siero di latte (> 150 pg/ml) in tutti i campioni (10, 20, 25 gg. post IS). Alcuni studi effettuati sul bufalo hanno dimostrato che la dinamica follicolare si manifesta ad ondate e che un forte decremento della concentrazione di P4 nel sangue periferico è registrato al 20mo-22mo giorno sia nei soggetti con 2 che in quelli con 3 ondate follicolari [Baruselli et al. 1997].

Pertanto, in questo lavoro gli alti livelli di P4 registrati fino al 25mo giorno, potrebbero essere associati ad una precoce mortalità embrionale (EEM) dovuta ad un inadatto riconoscimento materno fetale. Infatti è stato dimostrato che un precoce incremento di P4 (entro il 10mo giorno

dall'inseminazione) ottenuto con la somministrazione di una dose luteolitica di PGF<sub>2α</sub> il giorno dell'inseminazione, è in grado di determinare un incremento della percentuale di gravidanze di circa il 17% in bufale Mediterranee Italiane fecondate nel periodo di transizione [Neglia et al., 2008]. In ogni caso un'alta incidenza di mortalità embrionale tardiva nel bufalo è stata registrata tra il 25mo e il 40mo giorno dalla fecondazione [Campanile et al., 2005] e il ricorso ai trattamenti posticipati dà luogo ad un incremento della percentuale di gravidanza.

Infatti le bufale trattate con agonisti del GnRH, hCG, o progesterone a 25 gg. dalla fecondazione mostrano una riduzione della mortalità embrionale, raggiungendo livelli di P4 simili a quelli degli animali che mantengono la gravidanza [Campanile et al., 2008].

Questa osservazione suggerisce che il trattamento con ormoni trofici o progesterone a 25 gg. ha effetti benefici sull'attecchimento embrionale delle bufale. Anche nel presente lavoro il trattamento con progesterone (341 mg di 17-a hydroxyprogesterone caproate somministrato 3 volte intramuscolo a distanza di 4 gg.), buserelin o hCG a 25 gg. dall'inseminazione nelle bufale gravide incrementa la percentuale di gravidanza riducendo l'incidenza della mortalità embrionale.

In questo studio, l'incidenza della mortalità embrionale nel gruppo controllo, è stata simile (38,9%) a quella osservata in un precedente lavoro (45%) condotto nello stesso periodo dell'anno [**Campanile et al., 2005**].

I trattamenti per incrementare le concentrazioni di P4 non sempre sono efficaci nella riduzione della mortalità embrionale. Dall'analisi retrospettiva dei dati qui riportati si è osservato, infatti, che il trattamento tardivo non ha avuto alcun effetto sulle bufale che hanno presentato LEM. In questi soggetti è probabile che l'abbassamento della progesteronemia, avvenuto in un'epoca più precoce (20mo giorno dall'IS), ha compromesso la vitalità dell'embrione e di conseguenza il proseguimento della gestazione.

In bovine con mortalità embrionale fra il 35mo e il 42mo giorno dall'inseminazione si assiste ad una regressione del corpo luteo e ad una riduzione della concentrazione di P4 nel latte [**Wolff, 1992**].

Sebbene la perdita embrionale tardiva sia preceduta dalla luteolisi, non è esclusa la possibilità che la funzione del corpo luteo sia compromessa prima della perdita embrionale.

In un precedente studio fatto in bufale inseminate nel periodo di transizione [**Campanile et al., 2005**] è stato trovato un decremento della

progesteronemia al 10mo e al 20mo giorno dalla fecondazione in soggetti che hanno mostrato EM tra il 25mo e il 40mo giorno. Questa condizione è confermata da lavori condotti in bovine e pecore dove la mortalità embrionale precoce è associata ad una riduzione della concentrazione ematica di P4 [**Mann et Lamming 1999; 2001**].

Una ottimale attività luteinica e conseguentemente adeguate concentrazioni di P4 inducono un ambiente uterino appropriato e quindi una sufficiente crescita embrionale che sono le condizioni essenziali nel processo di impianto. Lo stretto dialogo tra il prodotto del concepimento e la madre è alla base di questo fenomeno perché la sincronizzazione dell'embrione con lo stato dell'utero è un punto critico per un impianto ottimale [**Psychoyos, 1973; Paria et al., 1993; Dey, 1996**]. In particolare, per tutto il periodo del “*transitory attachment*” che si verifica tra il 16mo e il 18mo giorno fino al 25mo-30mo giorno di gravidanza nei ruminanti, un ruolo chiave è espletato dalle glicoproteine transmembrana chiamate mucine-one (Muc-1) le quali sono state descritte in diverse specie di mammiferi incluso il bufalo [**Perucatti et al., 2006**].

La sintesi di queste proteine durante il periodo non recettivo per l'epitelio uterino è veramente alta, tuttavia questa mostra una drastica riduzione quando l'endometrio è esposto all'azione del P4. Nelle bovine è stato dimostrato che livelli elevati di P4 per 8-10 giorni sono capaci di

bloccare la sintesi delle Muc-1 agendo sulle cellule dell'endometrio [Geisert et Malayer, 2000].

Si potrebbe ipotizzare che bassi livelli di P4 tra il 20mo e il 25mo giorno in animali che vanno incontro a mortalità embrionale tardiva non siano sufficienti a bloccare la sintesi di Muc-1 determinando uno scorretto *transitory attachment*.

Tuttavia non si può escludere che i bassi livelli di P4 registrati al 20mo e al 25mo giorno siano responsabili di una ridotta crescita embrionale, risultante in una ridotta area di *attachment*, come precedentemente dimostrato nella pecora [Nephew et al., 1994; Khan et al., 2003; 2007].

Risulta plausibile che, a causa di uno dei fattori descritti precedentemente o di una combinazione di essi, la vitalità dell'embrione possa essere compromessa e i trattamenti non essere efficaci nella riduzione della mortalità embrionale.

La mortalità fetale in questo studio è risultata inferiore a quanto registrato in bufale sottoposte a monta naturale [Vecchio et al., 2007] nelle quali una più alta incidenza ( $P < 0,01$ ) della mortalità fetale (46-90 giorni di gestazione) è stata dimostrata in un periodo di incremento di ore di luce giornaliera (periodo di transizione Dicembre-Marzo) paragonato al periodo Aprile-Luglio.

La perdita di gravidanza in seguito al riconoscimento materno della stessa e durante la placentazione è un problema rilevante nella vacca da latte. Questo è associato a bassi livelli di P4 tra il 28mo e il 37mo giorno di gestazione i quali potrebbero essere dovuti ad una riduzione di secrezione di P4 da parte del corpo luteo o ad un aumento della metabolizzazione del P4 come descritto da **Inskeep (2004)**. In questo studio i livelli di P4 nel siero a 10, 20 , 25 gg. dalla fecondazione non differiscono da quelli degli animali gravidi a 70 gg. e dagli animali che hanno avuto mortalità fetale.

## 8. Conclusioni

La bufala ha grande capacità di adattamento ai diversi climi ed è un efficiente animale da reddito specialmente nelle aree tropicali e sub tropicali. Negli ambienti dove non c'è una significativa variazione annuale nel fotoperiodo (zone equatoriali), la maggiore influenza sulla riproduzione è esercitata dall'alimentazione. Le bufale vengono influenzate significativamente dal fotoperiodo con l'aumentare della distanza dall'equatore, ma l'alimentazione rimane sempre un fattore importante.

In Italia, dove esiste una realtà zootecnica bufalina assai avanzata, il regime alimentare è controllato e costante. Pertanto altri fattori sono chiamati in causa nel determinismo dell'efficienza riproduttiva in questa specie.

Infatti, numerose altre sono le cause che influenzano la fertilità delle bufale, particolarmente nel periodo sfavorevole alla loro attività riproduttiva.

Dai risultati ottenuti dall'espletamento di queste ricerche è emerso che la perdita di fertilità nella bufala sottoposta ad inseminazione artificiale dipende in gran parte dall'alterata funzionalità del corpo luteo. Una minore vascolarizzazione del follicolo preovulatorio già

comprometterebbe la successiva funzionalità delle cellule luteiniche. Un maggiore afflusso di sangue al follicolo rappresenterebbe la condizione essenziale, unitamente ad una ottimale vascolarizzazione precoce del corpo luteo, condizioni ottimali per lo sviluppo embrionale precoce. In definitiva una maggiore disponibilità di nutrienti nel fluido follicolare garantirebbe una maggiore qualità dell'ovocita e del successivo embrione. A questo si aggiunga che solitamente livelli più elevati di LH garantiscono una maggiore attività dei fattori vascolari e, quindi, una valutazione dello stato vascolare del follicolo potrebbe rappresentare una misura indiretta dello stadio di ciclicità dei soggetti da inseminare e della probabilità di successo dell'intervento inseminativo. Sicuramente un fattore condizionante la fertilità della specie bufalina è rappresentato, come più volte registrato nelle prove eseguite per lo svolgimento della seguente tesi, dal fenomeno della perdita embrionale che nella specie bufalina avviene in diverse epoche di gestazione. La mortalità embrionale nella bufala è condizionata dalla tendenziale stagionalità di questa specie e dall'influenza che la stagione presenta sull'attività del corpo luteo e di conseguenza sugli effetti delle concentrazioni di progesterone sui complessi fenomeni dell'*implantation*. Una buona vascolarizzazione delle cellule luteiniche garantisce una precoce e ottimale attività secretiva del corpo luteo, condizione essenziale per

assicurare un ambiente uterino idoneo allo sviluppo fetale e alla placentazione. Infatti, i soggetti che vanno incontro a perdita embrionale hanno fatto registrare livelli di progesterone inferiori. Poiché la mortalità embrionale nelle bufale inseminate nel periodo di transizione si verifica in un'epoca più tardiva rispetto alla bovina, ciò giustifica l'efficacia del trattamento tardivo sulla fertilità della specie bufalina sottoposta a IS nel periodo di transizione.

Tuttavia negli animali con basse concentrazioni di P4 sia al 20mo che al 25mo giorno la vitalità embrionale è probabilmente compromessa e quindi i trattamenti tardivi non sono sufficienti a ridurre la mortalità embrionale. Sulla base di questo studio sembrerebbe che i trattamenti dovrebbero essere effettuati prima del 25mo giorno dall'inseminazione per aumentare il range degli animali responsivi. Inoltre, poiché la mortalità fetale non è influenzata dai livelli di P4 fino al 25mo giorno, ulteriori studi sono necessari per valutare altri fattori implicati in questo fenomeno.

D'altronde, è pur vero che il ricorso a protocolli farmacologici non sempre risolve le problematiche relative alla perdita di fertilità della specie, particolarmente durante il periodo a luce crescente. Da quanto è emerso da tale elaborato, infatti, i trattamenti con  $\text{PGF}_{2\alpha}$  o con altre

molecole possono favorire la riduzione della mortalità embrionale, ma non agiscono nel favorire l'insorgenza della gravidanza.

Verosimilmente, dunque, una maggiore irrorazione del follicolo e/o del corpo luteo migliorerebbe l'incidenza di gravidanze attraverso una migliore attività delle suddette ghiandole legata alla maggiore disponibilità di ossigeno e di nutrienti.

Ricerche supplementari sono, quindi, necessarie per verificare in che modo favorire la vascolarizzazione del follicolo preovulatorio, utile da un lato a sincronizzare l'evento ovulatorio e, dall'altro, al successo dell'IS nel periodo sfavorevole all'attività riproduttiva di questa specie.

La presente tesi ha, infine, evidenziato la necessità di focalizzare maggiormente l'attenzione sulla fase dell'impianto embrionale nelle bufale, momento veramente critico per l'instaurarsi e la prosecuzione della gravidanza. Ciò rappresenta un'importante traguardo futuro per la ricerca che porterà ad effettuare notevoli passi avanti nella tecnologia, in modo tale da migliorare nel complesso le prestazioni riproduttive nelle bufale.

## 9. Referenze bibliografiche

- Abdalla, E.B., 2003. Improving the reproductive performance of Egyptian buffalo cows by changing the management system. *Anim. Reprod. Sci.* 75, 1–8.
- Acosta, T.J., Berisha, B., Ozawa, T., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A., 1999. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biol. Reprod.* 61(6):1419-25.
- Acosta, T.J., Ozawa, T., Kobayashi, S., Hayashi, K., Ohtani, M., Kraetzl, W.D., Sato, K., Schams, D., Miyamoto, A., 2000. Periovulatory changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin f(2alpha), and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biol. Reprod.* 63(5):1253-61.
- Acosta, T.J., Yoshizawa, N., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F2a injection in the cow. *Biol. Reprod.* 66,651–658.
- Acosta, T.J., Hayashi, K.G., Ohtani, M., Miyamoto, A., 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction.* 125(5):759-67.
- Adams, G.P., Matteri, R.L., Ginther, O.J., 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *J. Reprod. Fertil.* 95, 627–640.
- Andrade, J.C., Oliveira, M.A., Lima, P.F., Guido, S.I., Bartolomeu, C.C., Tenório Filho, F., Pina, V.M., Iunes-Souza, T.C., Paula, N.R.,

- Freitas, J.C., 2003. The use of steroid hormones in superovulation of Nelore donors at different stages of estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.* 77, 117–125.
- Anwar, M., Ullah, N., 1998. Early development and location of embryos in the reproductive tract of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*): a retrospective analysis. *Theriogenology* 49, 1187–1193.
  - Asahara, T., Bauters, C., Zheng, L.P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N., 1995. Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92, 1365–1371.
  - Avallone, L., Russo, F., d'Angelo, A., Campanile, G., Esposito, L., Infascelli, F., 1988. Andamento del progesterone durante il ciclo estrale della bufala. *Proceedings of the XLII Congr. S.I.S.Vet, Mantova, Italy*, pp. 289–291.
  - Avallone, L., Parmeggiani, A., Esposito, L., Campanile, G., 1994. Correlation between prolactin, T3 and T4 levels in buffalo heifers during the whole year. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Buffalo Congress, São Paulo, Brazil*, 477-479.
  - Barkawi, A.H., 1993. Postpartum reproductive pattern of suckling and non-suckling Egyptian buffaloes. *Egyptian Journal Animal Production* 30, 129–142.
  - Barros, C.M., Figueiredo, R.A., Papa, F.O., Rocha, G., 1993. Follicular growth in Nelore cows (*Bos indicus*) after PGF2 administration. *J. Anim. Sci.* 71, 216.
  - Bartness, T.J., Powers, J.B., Hastings, M.H., Bittman, E.L., Goldman, B.D., 1993. The timed infusion paradigm for melatonin delivery: what has it taught us about the melatonin signal, its

reception, and the photoperiodic control of seasonal responses? *Journal of Pineal Research*, 15, 161–190.

- Bartolomeu, A.J., Rei, M., Del Madureira, E.H., Souza, A.J., Silva, A.O., Baruselli, P.S., 2002. Timed insemination using synchronization of ovulation in buffaloes using CIDR-B, CRESTAR and Ovsynch. *Animal Breeding Abstract* 70, 332.
- Baruselli, P.S., Mucciolo, R.G., Visintin, J.A., Viana, W.G., Arruda, R.P., Madureira, E.H., Oliveira, C.A., Molero-Filho, J.R., 1997. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 47, 1531–1547.
- Baruselli, P.S., 2001. Control of follicular development applied to reproduction biotechnologies in buffalo. *Proceedings of the 1st Congresso Nazionale sull'Allevamento del Bufalo, Eboli (SA), Italy*, pp. 128–146.
- Baruselli, P.S., Bernardes, O., Braga, D.P.A.F., Araujo, D.C., Tonhati, H., 2001. Calving distribution throughout the year in buffalo raised all over Brazil. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> World Buffalo Congress, Maracaibo, Venezuela*, pp. 234-239.
- Baruselli, P.S., Bernardes, O., Braga, D.P.A.F., Araujo, D.C., Tonhati, H., 2001a. Factors affecting service period in dairy buffalo. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> World Buffalo Congress, Maracaibo, Venezuela*, pp. 228–233.
- Baruselli, P.S., Carvalho, N.A.T., Amaral, R., Nichi, M., 2002. Synchronization of ovulation for timed artificial insemination during the off breeding season in the buffalo. *Proceedings of the 1st Buffalo Symposium of Americas, Belém, Brazil*, pp. 418–420.

- Baruselli, P.S., Carvalho, N.A.T., 2005. Biotechnology of reproduction in buffalo (*Bubalus bubalis*). Revista Brasileira de Reprodução Animal 29, 4–17.
- Bergfelt, D.R., Kastelic, J.P., Ginther, O.J., 1991. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. Anim. Reprod. Sci. 24, 193–204.
- Boni, R., Roelofsen, V.M., Pieterse, M., Wurth, Y., Kruip, T.H.A.M., 1993. Follicular recruitment after repeated removal of all follicles  $\geq 2$ mm in bovine ovary. J. Reprod. Fertil. 12, 40.
- Borady, A.M.A., Abd-El-Aal, A.E., Farghaly, H.A.M., 1985. Seasonal variation in thyroid hormones and reproduction in the Egyptian water buffalo. Egyptian Journal of Animal Production, 25, 83-92.
- Borghese, A., Barile, V.L., Terzano, G.M., Pilla, A.M., Parmeggiani, A., 1995. Melatonin trend during season in heifers and buffalo cows. *Bubalus bubalis*, 1, 61-64.
- Brännström, M., Wang, L., Norman, R.J., 1993. Effects of cytokines on prostaglandin production and steroidogenesis of incubated preovulatory follicles of the rat. Biol Reprod. 48(1):165-71.
- Brännström, M., Zackrisson, U., Hagström, H.G., Josefsson, B., Hellberg, P., Granberg, S., Collins, W.P., Bourne, T., 1998. Preovulatory changes of blood flow in different regions of the human follicle. Fertil Steril. 69(3):435-42.
- Brito, L.F.C., Satrapa, R., Marson, E.P., Kastelic, J.P., 2002. Efficacy of PGF $2\alpha$  to synchronize estrus in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. Anim. Reprod. Sci. 73, 23–35.

- Bruke, C.R., Mihm, M., MacMillan, K.L., Roche, J.F., 1994. Some effects of premature concentrations of progesterone on luteal and follicular characteristics during the oestrus cycle in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 27–39.
- Campanile, G., Di Palo, R., Ferrari, G., Intrieri, F., Zicarelli, L., 1988. Influence of farm and climatic elements on the alfaprostol-induced heats in Mediterranean buffalo cows. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> World Buffalo Congress, New Delhi, India*, 40-48.
- Campanile, G., Di Palo, R., Esposito, L., Montemurro, N., Lucaroni, A., Todini, L., 1992. Anaestrus length in Italian buffalo cows. Note II. *Proceedings of the International Symposium on Prospect of Buffalo Production in the Mediterranean/Middle East; November 9-12; Cairo Egypt*, pp. 385-388.
- Campanile, G., Avallone, L., d' Angelo, A., Di Palo, R., Di Meo, C., 1994. Influence of the season and of the number of days after calving on the pattern of thyroid hormones in buffalo cows. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> World Buffalo Congress, São Paulo, Brazil*, 3: 564-567.
- Campanile, G., 1997. Relationship between nutrition and reproduction in buffalo. *Bubalus bubalis Suppl.* 4: 217-235.
- Campanile, G., Neglia, G., Gasparini, B., Galiero, G., Prandi, A., Di Palo, R., D'Occhio, M.J., Zicarelli, L., 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. *Theriogenology* 63, 2334–2340.
- Campanile, G., Neglia, G., 2007. Embryonic mortality in buffalo cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 2), 119–129 (Part 1).

- Campanile, G., Di Palo, R., Neglia, G., Vecchio, D., Gasparri, B., Prandi, A., Galiero, G., D'Occhio, M.J., 2007a. Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology*. 67(8):1393-8.
- Campanile, G., Vecchio, D., Zicarelli, L., Neglia, G., Di Palo, R., Balestrieri, A., D'Occhio, M.J., 2007b. Strategies to reduce embryonic mortality in buffalo cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 2), 680–683 (Part 1).
- Campanile, G., Vecchio, D., Rendina, M., Grassi, C., Balestrieri, A., Di Palo, R., 2007c. Ovary response and embryonic mortality in buffaloes treated with GnRH or hCG. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 2), 673–676 (Part 1).
- Campanile, G., Vecchio, D., Neglia, G., Di Palo, R., Prandi, A., D'Occhio, M.J., 2008. Progesterone and pregnancy status in buffaloes treated with a GnRH agonist. *Livestock Sci.* 115, 242–248.
- Campanile, G., Vecchio, D., Di Palo, R., Neglia, G., Gasparri, B., Prandi, A., Zicarelli, L., D'Occhio, M.J., 2008a. Delayed treatment with GnRH agonist, hCG and progesterone and reduced embryonic mortality in buffaloes. *Theriogenology* 70, 1544–1549.
- Carvalho, N.A., Baruselli, P.S., Zicarelli, L., Madureira, E.H., Visintin, J.A., D'Occhio, M.J., 2002. Control of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. *Theriogenology* 58, 1641–1650.
- Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Techakumphu, M., Kobayashi, G., Virakul, P., Kunayongkrit, A., Prateep, P., Limskul, A., 1989. Early embryonic development in Thai swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 31, 1131–1139.

- Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W., 1999. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest.* 103(3):401-6.
- Collins, W., Jurkovic, D., Bourne, T., Kurjak, A., Campbell, S., 1991. Ovarian morphology, endocrine function and intra-follicular blood flow during the peri-ovulatory period. *Hum Reprod.* 6(3):319-24.
- Coulam, C.B., Goodman, C., Rinehart, J.S., 1999. Colour Doppler indices of follicular blood flow as predictors of pregnancy after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 14(8):1979-82.
- Danell, B., 1987. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers. PhD Thesis. Uppsala, Faculty of Veterinary Medicine, Swedish University of Agricultural Sciences, p. 124.
- Dey, S.K., 1996. Implantation. In: Adashi, E.Y., Rock, J.A., Rosenwaks, Z. (Eds.), *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Lippincott-Raven Publishers, New York, pp. 421–434.
- Diaz, F.J., Anderson, L.E., Wu, Y.L., Rabot, A., Tsai, S.J., Wiltbank, M.C., 2002. Regulation of progesterone and prostaglandin F (2alpha) production in the CL. *Mol. Cell. Endocrinol.* 91, 65–80.
- Di Palo, R., Esposito, L., Campanile, G., Consalvo, F., Galasso, D., 1990. Corpus luteum dimension and follicle presence at the PGF<sub>2</sub> $\alpha$  administration on the buffalo cows fertility. *Proceedings of the 3th National Meeting “Studio della efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico”*, Bergamo, Italy, pp. 67–72.

- Di Palo, R., Parmeggiani, A., Campanile, G., Zicarelli, L., 1993. Repeatability of melatonin plasma levels in buffaloes bred in Italy. Proceedings XLVII S.I.S.Vet, Riccione, Italy, 1, 331-333.
- Di Palo, R., Parmeggiani, A., Spadetta, M., Campanile, G., Esposito, L., Seren, E., Zicarelli, L., 1997. Influence of changing farm on the repeatability of melatonin plasma level in italian Mediterranean buffalo. Proceedings of the 5<sup>th</sup> World Buffalo Congress, Caserta, Italy, 758—761.
- Drost, M., Elsdon, R.P., 1985. Blastocyst development in water buffalo (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 23, 191.
- El-Sheikh, A.S., Sakla, F.B., Amin, S.O., 1967. Changes in the density and progesterone content of luteal tissue in the Egyptian buffalo during the estrous cycle. J. Endocrinol. 39, 163–171.
- El-Wishy, A.B., 2007. The postpartum buffalo (part II). Acyclicity and anestrus. Anim. Reprod. Sci. 97, 216–236.
- Espey, L.L., 1994. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. Biol Reprod.50(2):233-8.
- Esposito, L., Campanile, G., Di Palo, R., Boni, R., Di Meo, C., Zicarelli, L., 1992. Seasonal reproductive failure in buffaloes bred in Italy. Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, The Hague, Nederland, 2045-2047.
- Fortune, J.E., Sirois, J., Turzillo, A.M., Lavoie, M., 1991. Follicle selection in domestic ruminants. J. Reprod. Fertil. 43, 187–198.
- Fortune, J.E., 1993. Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: a limiting factor in improvement of fertility? Anim. Reprod. Sci. 33, 111–125.

- Garrett, J.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Morgan, G.L., 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*. 84, 437-446.
- Garverick, H.A., Zollers, W.G., Smith, M.F., 1992. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. *Animal Reproduction Science* 28, 111-124.
- Gasparrini, B., 2002. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. *Theriogenology* 57, 237–256.
- Geisert, R.D., Malayer, J.R., 2000. Implantation. In: Hafez, B., Hafez, E.S.E. (Eds.), *Reproduction in farm Animals*, 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 126–139.
- Ghosh, J., Mondal, S., 2006. Nucleic acids and protein content in relation to growth and regression of buffalo (*Bubalus bubalis*) corpora lutea. *Anim. Reprod. Sci.* 93, 316–327.
- Gill, R.S., Gangwar, P.C., Kooner, D.S., 1973. Studies on the oestrous behaviour in buffaloes. *Indian J. Anim. Sci.* 43, 472–475.
- Gimenes, L.U., Carvalho, N.A.T., Sá Filho, M.F., Torres, J.J.R.S., Ayres, H., Vannucci, F.S., Bianconi, L.L., Bisinotto, R.S., Reichert, R.H., Beltran, M.P., Nogueira, G.P., Baruselli, P.S., 2007. Follicle selection by ultrasonography and plasmatic characteristics and ovulatory capacity in buffaloes. *Ital. J. Anim. Sci.* 6, 629–631.
- Gimenes, L.U., Sá Filho, M.F., Carvalho, N.A.T., Torres-Júnior, J.R., Souza, A.H., Madureira, E.H., Trinca, L.A., Sartorelli, E.S., Barros, C.M., Carvalho, J.B., Mapletoft, R.J., Baruselli, P.S., 2008. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* 69, 852–858.

- Gimenes, L.U., Fantinato Neto, P., Arango, J.S.P., Ayres, H., Baruselli, P.S., 2009. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Anim. Reprod.* 6, 256.
- Ginther, O.J., Kastelic, J.P., Knopf, L., 1989. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. *Theriogenology* 32, 787–795.
- Ginther, O.J., Knopf, L., Kastelic, J.P., 1989a. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. *J. Reprod. Fertil.* 87, 223–230.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., Kot, K., 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187–1194.
- Ginther, O.J., Beg, M.A., Bergfelt, D.R., Donadeu, F.X., Kot, K., 2001. Follicle selection in monovular species. *Biol. Reprod.* 65, 638–647.
- Hafs, H.D., Armstrong, D.T., 1968. Corpus luteum growth and progesterone synthesis during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 27, 134–141.
- Huey, S., Abuhamad, A., Barroso, G., Hsu, M.I., Kolm, P., Mayer, J., Oehninger, S., 1999. Perifollicular blood flow Doppler indices, but not follicular pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, or pH, predict oocyte developmental competence in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 72(4):707-12.
- Inskip, E.K., 2004. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* 82, E24–39.

- Janson, P.O., 1975. Effects of the luteinizing hormone on blood flow in the follicular rabbit ovary, as measured by radioactive microspheres. *Acta Endocrinol (Copenh)*.79(1):122-33.
- Kaker, M.L., Radzan, M.N., Galhotra, M.M., 1980. Serum LH concentration in cyclic buffalo (*Bubalus bubalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 60, 419-24.
- Karaivanov, C., Vlahov, K., Petrov, M., Kacheva, D., Stojanova, M., Alexiev, A., Polihronov, O., Danev, A., 1987. Studies on preimplantation development of buffalo embryos. *Theriogenology* 28, 747–753.
- Karen, A., Darwish, S., Ramoun, A., Tawfeek, K., Van Hanh, N., de Sousa, N.M., Sulon, J., Szenci, O., Beckers, J.F., 2007. Accuracy of ultrasonography and pregnancy-associated glycoprotein test for pregnancy diagnosis in buffaloes. *Theriogenology* 68, 1150–1155.
- Karsch, F.J., Dahl, G.E., Hachigian, T.M., Thrun, L.A., 1995. Involvement of thyroid hormones in seasonal reproduction. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 49, 409-442.
- Kashida, S., Sugino, N., Takiguchi, S., Karube, A., Takayama, H., Yamagata, Y., Nakamura, Y., Kato, H., 2001. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol. Reprod.* 64, 317–323.
- Khan, T.H., Hastie, P.M., Beck, N.F.G., Khalid, M., 2003. hCG treatment on day of mating improves embryo viability and fertility in ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 76, 81–89.
- Khan, T.H., Beck, N.F.G., Khalid, M., 2007. The effects of GnRH analogue (buserelin) or hCG (Chorulon) on Day 12 of pregnancy on ovarian function, plasma hormone concentrations,

conceptus growth and placentation in ewes and ewe lambs. *Anim Reprod Sci* 102, 247–257.

- Khattab, R.M., Abul-Ela, M.B., Barkawi, A.H., Abdel-Aal, A.E., 1990. Physiological causes influencing open period in Egyptian buffaloes of hot season calvers. *Buffalo J.* 6, 143–160.
- Kobayashi, S., Berisha, B., Amselgruber, W.M., Schams, D., 2001. Production and localization of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2a. *J. Endocrinol.* 170, 369–380.
- Kobayashi, S., Acosta, T.J., Ozawa, T., Hayashi, K., Berisha, B., Ohtani, M., Schams, D., Miyamoto, A., 2002. Intraluteal release of angiotensin II and progesterone in vivo during corpora lutea development in the cow: effect of vasoactive peptides. *Biol Reprod.* 66(1):174-9.
- Kumar, R., Jindal, R., Rattan, P.J.S., 1991. Plasma hormonal profiles during oestrous cycle of murrh buffalo heifers. *Indian J. Anim. Sci.* 61, 382–385.
- Kumaresan, A., Ansari, M.R., 2001. Evaluation of conception rate in buffaloes (*Bubalus bubalis*) with reference to semen quality, stage of estrus and inseminator. *Indian J. Anim. Sci.* 71 (2), 144–145.
- Lamberson, W.R., Ramos, A.A., Malhado, C.H.M., Jorge, A.M., Ferraz Filho, P.B., DeFreitas, J.A., De Souza, J.C., 2007. Parturition intervals and distributions of parturitions by months of buffalo in Southern an South-eastern Brazil. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (Supp. 2), 593–596.

- Lincoln, G.A., 1979 . Photoperiodic control of seasonal breeding in the ram: participation of the cranial sympathetic nervous system. *Journal of Endocrinology* 82, 135-147.
- Lincoln, G.A., 1992. Photoperiod-pineal-hypothalamic relay in sheep. *Animal Reproduction Science* 28, 203-271.
- Lincoln, G.A., Anderson, H., Loudon, A., 2003. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals—a unifying hypothesis. *Journal of Endocrinology* 179, 1–13.
- Lincoln, A.G., Johnston, J.D., Andersson, H., Wagner, G., Hazlerigg, D.G., 2005. Photorefractoriness in Mammals: Dissociating a Seasonal Timer from the Circadian-Based Photoperiod Response. *Endocrinology* 146 (9), 3782-3790.
- Lucy, M.C., Savio, J.D., Badinga, R.L., De La Sota, R.L., Thatcher, W.W., 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. Anim. Sci.* 70, 3615–3626.
- Madan, M.L., 1988. Status of reproduction in female buffalo. 2<sup>nd</sup> World Buffalo Congress, New Delhi, India, 89-100.
- Maeda, K.I., Lincoln, G.A., 1990. Phase shifts in the circadian rhythm in plasma concentrations of melatonin in rams induced by a 1-hour light pulse. *Journal of Biological Rhythms* 5, 97-106.
- Manik, R.S., Madan, M.L., Singla, S.K., 1994. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. *Theriogenology* 41, 247.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., 1999. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 269–274.

- Mann, G.E., Lamming, G.E., 2001. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121, 175–180.
- Mapletoft, R.J., Bo, G.A., Pierson, R.A., 1994. Recruitment of follicles for superovulation. *Compend. Cont. Educ. Pract. Vet.* 16, 127–141.
- Mares, S.E., Zimbelman, R.G., Casida, L.E., 1962. Variation in progesterone content of the bovine corpus luteum of the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 21, 266–271.
- Mattioli, M., Barboni, B., Turriani, M., Galeati, G., Zannoni, A., Castellani, G., Berardinelli, P., Scapolo, P.A., 2001. Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension. *Biol Reprod.* 65(4):1014-9.
- Misra, A.K., Joshi, B.V., Kasiraj, R., Sivaiah, S., Rangareddi, N.S., 1991. Improved superovulatory regimen for buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 35, 245.
- Miyazaki, T., Tanaka, M., Miyakoshi, K., Minegishi, K., Kasai, K., Yoshimura, Y., 1998. Power and colour Doppler ultrasonography for the evaluation of the vasculature of the human corpus luteum. *Hum. Reprod.* 13(10):2836-41.
- Moor, R.M., Hay, M.F., Seamark, R.F., 1975. The sheep ovary: regulation of steroidogenic, haemodynamic and structural changes in the largest follicle and adjacent tissue before ovulation. *J Reprod Fertil.* 45(3):595-604.
- Mondal, M., Prakash, B.S., 2004. Effects of long-term growth hormone-releasing factor (GRF) administration on pattern of GH and LH secretion in growing female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Reproduction* 127, 45–55.

- Morgan, P.J., Williams, L.M., 1989. Central melatonin receptors: implications for a mode of action. *Experientia*, 45, 955-965.
- Murdoch, W.J., Peterson, T.A., Van Kirk, E.A., Vincent, D.L., Inskeep, E.K., 1986. Interactive roles of progesterone, prostaglandins, and collagenase in the ovulatory mechanism of the ewe. *Biol Reprod.* 35(5):1187-94.
- Nascimento, V.A., Dias, M., Machado, T.M.M., 2007. Reproductive and productive performance of water buffaloes in central plateau of Brazil. *Italian Journal of Animal Science* 6 (Suppl. 2), 640-642.
- Neglia, G., Gasparri, B., Caracciolo di Brienza, V., Presicce, G.A., Zicarelli, L., 2001. Buffalo and Bovine in vitro embryo production from ovum pick up and abattoir derived oocytes. *Proceedings of the A.S.P.A., XIV Congress, Florence, Italy*, pp. 624–626.
- Neglia, G., Gasparri, B., Di Palo, R., De Rosa, C., Zicarelli, L., Campanile, G., 2003. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology*.60(1):125-33.
- Neglia, G., Natale, A., Esposito, G., Salzillo, F., Adinolfi, L., Zicarelli, L., Francillo, M., 2007. Follicular dynamics in synchronized Italian Mediterranean buffalo cows. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 2), 611–614 (Part 1).
- Neglia, G., Natale, A., Esposito, G., Salzillo, F., Adinolfi, L., Campanile, G., Francillo, M., Zicarelli, L., 2008. Effect of prostaglandin F2 $\alpha$  at the time of A.I. on progesterone levels and

pregnancy rate in synchronized Italian Mediterranean buffaloes. *Theriogenology* 69, 953–960.

- Nephew, K.P., Cardenas, H., McClure, K.E., Ott, T.L., Bazer, F.W., Pope, W.F., 1994. Effects of administration of human chorionic gonadotropin or progesterone before maternal recognition of pregnancy on blastocyst development and pregnancy in sheep. *J Anim Sci* 72, 453–458.
- Niswender, G.D., Reimers, T.J., Diekman, M.A., Nett, T.M., 1976. Blood flow: a mediator of ovarian function. *Biol Reprod.*14(1):64-81.
- Niswender, G.D., Nett, T.M., 1994. Corpus luteum and its control in infraprimate species. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp. 781–716.
- Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.* 80, 1–29.
- Ohashi, O.M., 1994. Estrous detection in buffalo cow. *Buffalo J.* 2, 61–64.
- Oropeza, A.J., Rojas, A.F., Velazquez, M.A., Muro, J.D., Márquez, Y.C., Vilanova, L.T., 2010. Efficiency of two timed artificial insemination protocols in Murrah buffaloes managed under a semi-intensive system in the tropics. *Trop Anim Health Prod*: 42:1149–1154.
- Papa, P.C., Moura, C.E., Artoni, L.P., Fátima, L.A., Campos, D.B., Marques Jr., J.E., Baruselli, P.S., Binelli, M., Pfarrer, C., Leiser, R., 2007. VEGF system expression in different stages of estrous cycle in the corpus luteum of non-treated and superovulated water buffalo. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 379–389.

- Paria, B.C., Huet-Hudson, Y., Dey, S.K., 1993. Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 10159–10162.
- Parmeggiani, A., Di Palo, R., 1994. Melatonina e stagionalità riproduttiva della bufala. *Agricoltura e Ricerca* 153, 41-48.
- Pepperell, J.R., Yamada, Y., Nemeth, G., Palumbo, A., Naftolin, F., 1995. The ovarian renin-angiotensin system. A paracrine-intracrine regulator of ovarian function. *Adv Exp Med Biol.* 377:379-89.
- Perera, B.M.A.O., Kuruwita, V.Y., Mohan, V., Chandratilake, D., Karunaratne, A.M., 1988. Effect of some managerial factors on postpartum reproduction in buffaloes and goats. *Acta Vet. Scand.* 83, 91–100.
- Perucatti, A., Floriot, S., Di Meo, G.P., Soglia, D., Rullo, R., Maione, S., Incarnato, D., Eggen, A., Sacchi, P., Rasero, R., Iannuzzi, L., 2006. Comparative FISH mapping of mucin 1, transmembrane (MUC1) among cattle, river buffalo, sheep and goat chromosomes: Comparison between bovine chromosome 3 and human chromosome 1. *Cytogenet. Genome Res.* 112, 103–105.
- Pescador, N., Soumano, K., Stocco, D.M., Price, C.A., Murphy, B.D., 1996. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 55, 485–491.
- Porto-Filho, R.M., Baruselli, P.S., Madureira, E.H., Mucciolo, R.G., 1999. Detecção de cio em búfalas através do sistema de radiotelemetria. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 23, 356–358.
- Prandi, A., Comin, A., Gabai, G., Pischiutti, C., Bono, G., 1992. Dosaggio diretto del progesterone nel siero di latte e sua

applicazione nel controllo della fertilità delle bovine. Arch Vet Ital 43, 22–28.

- Prandi, A., Motta, M., Tondolo, A., Rossi, C., 1994. Evaluation of the reproductive efficiency of Simmental and Friesian cows farmed in Friuli (Northeast Italy) by the analysis of progesterone levels. Theriogenology 42, 65–78.
- Presicce, G.A., Parmeggiani, A., Senatore, E.M., Stecco, R., Barile, V.L., De Mauro, G.J., De Santis, G., Terzano, G.M., 2003. Hormonal dynamics and follicular turnover in prepuberal Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*). Theriogenology 60, 485–493.
- Presicce, G.A., Senatore, E.M., Bella, A., Santis, G., Barile, V.L., Mauro, G.J., Terzano, G.M., Stecco, R., Parmeggiani, A., 2004. Ovarian follicular dynamics and hormonal profiles in heifer and mixed-parity Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*) following an estrus synchronization protocol. Theriogenology 61, 1343–1355.
- Psychoyos, A., 1973. Endocrine control of egg implantation. In: Greep, R.O., Astwood, E.G., Geiger, S.R. (Eds.), Handbook of Physiology. American Physiological Society, Washington, D.C., U.S.A., pp. 187–215.
- Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and GnRH. Theriogenology 44:915–923.
- Radzan, M.N., Kaker, M.L., Gallhotra, M.N., 1981. Serum luteinizing hormone levels of un-cycling buffaloes (*Bubalus bubalis*). Indian Journal of Animal Science 51, 286.

- Rajakoski, E., 1960. Ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal cyclical and left–right variations. *Acta Endocrinol.* 34, 379–392.
- Rao, C.H., Rao, C.V., Naidu, K.N., 1981. Heat detection during off-season in buffaloes. *Indian Vet. J.* 58, 588–589.
- Rhodes, F.M., Death, G., Entwistle, K.W., 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 38, 265–277.
- Romero, A., Albert, J., Brink, Z., Seidel Jr., G.E., 1991. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. *Theriogenology* 35, 265.
- Roy, A., Raizada, B.C., Tewari, R.B.L., Pandey, M.D., Yadav, P.C., Sengupta, B.P., 1968. Effect of management on the fertility of buffalo cows bred during summer. *Indian Journal of Veterinary Science* 38, 554-560.
- Roy, K.S., Prakash, B.S., 2009. Plasma progesterone, oestradiol-17beta and total oestrogen profiles in relation to oestrous behaviour during induced ovulation in Murrah buffalo heifers. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 93, 486–495.
- Russo, M., Vecchio, D., Neglia, G., Pacelli, C., Prandi, A., Gasparrini, B., Zicarelli, L., D’Occhio, M.J., Campanile, G., 2010. Corpus luteum function and pregnancy outcome in buffaloes during the transition period from breeding to non-breeding season. *Reprod. Domest. Anim.* 45(6):988-91.
- Sartori, R., Fricke, P.M., Ferreira, J.C.P., Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reprod.* 65, 1403–1409.

- Sartorelli, E.S., Carvalho, L.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., Barros, C.M., 2005. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* 63, 2382–2394.
- Savio, J.D., Thatcher, W.W., Badinga, R.L., Sota, R.L., Wolfenson, D., 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. *J. Reprod. Fertil.* 97, 197–203.
- Seren, E., Parmeggiani, A., Campanile, G., 1995. The control of ovulation in Italian buffalo. *Proceedings of the Symposium Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy*, Milan, Italy, pp. 265–275.
- Shah, S.N.H., 1990. Prolonged calving intervals in the Nili Ravi buffalo. PhD Thesis, Utrecht University, The Netherlands.
- Sheth, A.R., Wadaker, K.B., Moodbidri, S.B., Janakiraman, J., Parameswaran, M., 1978. Seasonal alteration in the serum prolactin and LH levels in the water buffalo. *Current Science* 47, 75-77.
- Singh, V., Desai, R.N., 1979. Calving/breeding season and calving interval of buffaloes in Northern India. *Indian Journal of Animal Science*, 49 (4), 256-260.
- Singh, G., 1988. Seasonal trend of calving and subsequent service-period in rural buffaloes in Punjab (India). *Acta Vet. Scand. Suppl.* 83: 80-84.
- Singla, S.K., Manik, R.S., Madan, M.L., 1996. Embryo biotechnologies in buffaloes: A review. *Bubalus bubalis*. 1: 53-63.
- Sirois, J., Fortune, J.E., 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.* 39, 308–317.

- Sirois, J., Fortune, J.E., 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology* 127, 916–925.
- Stocco, D.M., 2001. Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol. Endocrinol.* 15, 1245–1254.
- Stormshak, F., Inskip, E.K., Lynn, J.E., Pope, A.L., Casida, L.E., 1963. Progesterone levels in corpora lutea and ovarian effluent blood of the ewe. *J. Anim. Sci.* 22, 1021.
- Tedeschi, C., Lohman, C., Hazum, E., Ittoop, O., Ben-Shlomo, I., Resnick, C.E., Payne, D.W., Adashi, E.Y., 1994. Rat ovarian granulosa cell as a site of endothelin reception and action: attenuation of gonadotropin-stimulated steroidogenesis via perturbation of the A-kinase signaling pathway. *Biol Reprod.* 51(5):1058-65.
- Ty, L.V., Chupin, D., Driancourt, D.A., 1989. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. *Anim. Reprod. Sci.* 19, 171–178.
- Vale, W.G., Weitz, K.F., Grunert, E., 1984. Estrous behaviour and ovarian function in water buffalo cows (*Bubalus bubalis* Lin) under amazon condition. *Proceedings of the International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, Urbana. University of Illinois, USA, p. 159.
- Vale, W.G., Ohashi, O.M., Sousa, J.S., Ribeiro, H.F.L., Silva, A.O.A., Nanba, S.Y., 1989. Morte embrionaria e fetal em bufalos, *Bubalus bubalis* Lin. *Revista Brasileira de Reproducao Animal.* 13: 157–165.
- Vale, W.G., Ohashi, O.M., 1994. Problems of reproduction in buffaloes. *Buffalo Journal Supplement* 2, 103-122.

- Vale, W.G., Ribeiro, H.F.L., Silva, A.O.A., Sousa, J.S., Ohashi, O.M., Souza, H.E.M., 1996. Buffalo a non-seasonal breeder in the Amazon Valley, Brazil. Proceedings 13<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction, Sidney, Australia, vol. 3, 19-33.
- Varga, B., Horváth, E., Folly, G., Stark, E., 1985. Study of the luteinizing hormone-induced increase of ovarian blood flow during the estrous cycle in the rat. *Biol Reprod.*32(3):480-8.
- Vecchio, D., Neglia, G., Rendina, M., Marchiello, M., Balestrieri, A., Di Palo, R., 2007. Dietary influence on primiparus and pluriparus buffalo fertility. *Italian Journal of Animal Science*, 6 (Suppl. 1), 512 – 514.
- Vecchio, D., Neglia, G., Di Palo, R., Prandi, A., Gasparrini, B., Balestrieri, A., D'Occhio, M.J., Zicarelli, L., Campanile, G., 2010. Is a Delayed Treatment with GnRH, hCG or Progesterone Beneficial for Reducing Embryonic Mortality in Buffaloes? *Reprod Domest Anim* , 45(4):614-8.
- Wathes, D.C., Robinson, R.S., Mann, G.E., Lamming, G.E., 1998. The establishment of early pregnancy in cows. *Reprod Dom Anim*; 33: 279–84.
- Wiltbank, M.C., Dysko, R.C., Gallagher, K.P., Keyes, P.L., 1988. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *J Reprod Fertil.*84(2):513-20.
- Wolff, N., 1992. Detection of embryonic mortality in cattle using sonography. *Tierarztl Prax* 20, 373–380.
- Yoshimura, Y., 1997. The ovarian renin-angiotensin system in reproductive physiology. *Front Neuroendocrinol.*18(3):247-91.

- Zicarelli, L., Di Lella, T., De Franciscis, G., 1977 . Osservazione e rilievi sui parametri riproduttivi e produttivi di bufale in allevamento presso un'azienda della piana del Sele. *Acta Medica Veterinaria* 23, 183-206.
- Zicarelli, L., Campanile, G., Infascelli, F., Esposito, L., Ferrari, G., 1988. Incidence and fertility of heats with double ovulations in the Mediterranean buffalo cows. *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> World Buffalo Congress, New Delhi, India*, 57-62.
- Zicarelli, L., Campanile, G., Infascelli, F., Esposito, L., 1988a. Influenza del periodo, dell'età e della distanza dal parto sull'anaestro primaverile della bufala. *Rivista di Zootecnica e Veterinaria* 16, 21-31.
- Zicarelli, L., Campanile, G., Infascelli, F., Esposito, L., 1988b. Durata del calore (intertempo tra il suo inizio e la sua fine) ed ovulazione nella bufala in funzione del momento stagionale: confronto tra estri spontanei e indotti con alfaprostol. *Rivista di Zootecnica e Veterinaria* 16, 33-55.
- Zicarelli, L., 1992. Recenti acquisizioni sull'attività riproduttiva nella bufala. *Proceedings of the 4<sup>th</sup> Meeting Nazionale su " Studio dell'efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico "*, Bergamo, Italy, 9-39.
- Zicarelli, L., Di Palo, R., Palladino, M., Campanile, G., Esposito, L., 1992. Embryo transfer in Mediterranean *Bubalus bubalis*. *Proceedings of the Int. Symp. Prospects of Buffalo Production in the Mediterranean and the Middle East, Cairo, Egypt*, pp. 73–75.
- Zicarelli, L., 1994. Management under different environmental conditions. *Buffalo Journal Supplement* 2, 17-38.

- Zicarelli, L., 1994a. Anaestro e induzione dell'estro in bufale acicliche. *Agricoltura e Ricerca* 153, 55-81.
- Zicarelli, L., 1997. Reproductive seasonality in buffalo. *Proceedings of the Third Course on Biotechnology of Reproduction in Buffaloes*, Caserta, Italy, 29–52.
- Zicarelli, L., Esposito, L., Campanile, G., Di Palo, R., Armstrong, D.T., 1997. Effect of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows. *Animal Reproduction Science* 47, 171-180.
- Zicarelli, L., Baruselli, P.S., Campanile, G., Di Palo, R., Gasparrini, B., Neglia, G., D'Occhio, M.J., 2000. Embryo recovery in buffalo with timed ovulation and insemination subsequent to follicle superstimulation. *Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction (ICAR)*, Stockholm, Sweden, p. 125.
- Zicarelli, L., 2007. Can we consider buffalo a non precocious and hypofertile species? *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (Suppl. 2), 143–154 (Part 1).
- Zimmermann, R.C., Hartman, T., Bohlen, P., Sauer, M.V., Kitajewski, J., 2001. Preovulatory treatment of mice with anti-VEGF receptor 2 antibody inhibits angiogenesis in corpora lutea. *Microvasc. Res.* 62, 15–25.