



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dip. AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE NATURALI E AMBIENTE
di riferimento del CdS Scienze e tecnologie animali L

Corso di laurea
Scienze e tecnologie animali

RELAZIONE TRA VASCOLARIZZAZIONE DEI CORPI LUTEI ED INTENSITÀ DEI GRIGI CON
ECOCOLOR DOPPLER NELLE PECORE

Relatore
Prof. Calogero Stelletta

Laureando
Sebastiano Stecchezzini
Matricola n. 1225978

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

1.INTRODUZIONE:	1
1.1 PREMESSA	1
1.2 ANATOMIA PICCOLI RUMINANTI	1
1.2.1 L'UTERO	1
1.2.3. CORPO LUTEO	3
1.2.4. FASE LUTEALE	3
1.3. TECNICHE ECOGRAFICHE	4
1.3.1 ECOGRAFIA	4
1.3.2 ULTRASUONI	4
1.3.3. CARATTERISTICHE DELL'ONDA ULTRASONORA	6
1.3.4. APPARECCHIATURA	10
1.3.5. TERMINOLOGIA ECOGRAFICA	12
1.3.6 SISTEMI DI VISUALIZZAZIONE	15
1.3.7 ECOCOLOR DOPPLER	19
1.4. MANIPOLAZIONE DEL CICLO ESTRALE:	23
1.4.1 STAGIONALITÀ:	23
1.4.2 EFFETTO MASCHIO:	25
1.5 INDUZIONE E SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO DURANTE LA STAGIONE RIPRODUTTIVA	26
1.5.1 TRATTAMENTO CON PROGESTINICI	26
1.5.2 TRATTAMENTO CON PGF2A	27
1.6 INDUZIONE E SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO FUORI STAGIONE RIPRODUTTIVA	27
1.6.1 TRATTAMENTO CON PROGESTINICI	28
1.6.2 TRATTAMENTTO CON PGF2A	28
1.6.3 TRATTAMENTO CON GONADOTROPINE	28
1.6.4 TRATTAMENTO CON β -NGF	30
2. SCOPO DELLA TESI	30
3.MATERIALI E METODI	31
3.2 METODO DI UTILIZZO DEL PROGRAMMA IMAGEJ: NOZIONI DI BASE E COMANDI UTILI PER L'ANALISI DELLE IMMAGINI ECOGRAFICHE	31
3.1.1 TIPOLOGIE DI IMMAGINI	31
3.1.2 COMANDI DEL MENÙ	34
3.1.3 CREAZIONE DELL'ISTOGRAMMA	35
3.1.4 METODO DI ANALISI DELLE IMMAGINI ECOGRAFICHE	36
4. RISULTATI	40
5. DISCUSSIONE	45
6. CONCLUSIONE	47
7. BIBLIOGRAFIA:	48

ABSTRACT

Lo scopo di questo studio è centrato sull'uso di ImageJ come metodo di analisi per trovare una relazione tra vascolarizzazione e intensità media dei pixel nelle immagini ecografiche esaminate. lo studio è stato condotto su 95 pecore Kivircjk per osservare l'influenza che la somministrazione di PMSG (gonadotropina sierica di cavalla incinta) ha sulla vascolarizzazione, volume e intensità complessivi dei pixel nella scala dei grigi. Tutte le pecore sono state sottoposte a sincronizzazione dell'estro progestinico tramite una spugna intravaginale per 11 giorni. I gruppi di pecore esaminati sono stati costituiti somministrando: 350 o 400 U.I. PMSG con 100 o 250 U.I. di NGF (350NGF, 400NGF) o senza NGF (350, 400), senza aver ricevuto alcuna somministrazione (controllo) e con la sola somministrazione di 100 o 250 U.I. di NGF (NGF).

Utilizzando il programma di analisi ImageJ, le immagini ecografiche sono state esaminate con valutazione soggettiva (1-5 gradi) e oggettiva (1-5 gradi) della vascolarizzazione del corpo luteo.

Quindi sono stati calcolati il volume, l'intensità percentuale della scala di grigi dei pixel e la cavità dei corpi lutei.

Analizzati i dati è stato osservato che la somministrazione di PMSG influenza la vascolarizzazione, il volume medio e il livello di intensità di grigio dei pixel ma tra la percentuale di vascolarizzazione ed l'intensità media dei pixel non è stato possibile evidenziare una relazione lineare.

The aim of this study is centered on the use of ImageJ as an analysis method to find a relationship between vascularity and mean pixel intensity in the ultrasound images examined. The study was conducted in 95 Kivircjk sheep to observe the influence that the administration of PMSG (serum gonadotropin of pregnant mare) has on the overall vascularity, volume and intensity of the pixels in the gray scale. All sheep were subjected to progestogen estrus synchronization with an intravaginal sponge for 11

days. The groups of sheep examined were constituted by administering: 350 or 400 I.U. PMSG with 100 or 250 I.U. NGF (350NGF, 400NGF) or without NGF (350, 400), without having received any administration (control) and with the only administration with 100 or 250 I.U. NGF (NGF).

Using the ImageJ analysis program, ultrasound images were examined with subjective (1-5 degrees) and objective (1-5 degrees) assessment of corpus luteum vascularity.

Then the volume, the percentage intensity of the grayscale of the pixels and the cavity of the corpora lutei were calculated.

Analyzing the data it was observed that the administration of PMSG influences the vascularization, the mean volume and the level of gray intensity of the pixels but between the percentage of vascularization and the mean intensity of the pixels it was not possible to highlight a linear relationship.

1.INTRODUZIONE:

1.1 PREMESSA

In questo lavoro sono state analizzate le immagini ecografiche di corpi lutei di pecore di razza Kivircjk inseminate artificialmente, una razza originaria della provincia turca di Izmir. Le immagini ecografiche sono state accostate ad ecocolor doppler per osservare il grado di vascolarizzazione dei tessuti. Sono state rielaborate al computer con il software ImageJ delimitando le aree vascolarizzate ed osservando se nelle immagini catturate con l'ecografia B-mode si riscontrasse una relazione tra le scale di grigio e la vascolarizzazione raffigurata con ecocolor doppler. L'obiettivo di questo studio è l'utilizzo del programma di analisi ImageJ allo scopo di trovare una relazione tra la valutazione oggettiva e soggettiva della vascolarizzazione nelle immagini ecografiche. Osservare l'influenza che il PMSG (Gonadotropina sierica di cavalla gravida) ha sulla vascolarizzazione del corpo luteo (CL) e se esiste una relazione tra le intensità di grigio e la vascolarizzazione.

Più nello specifico nel primo capitolo viene approfondita l'anatomia dei piccoli ruminanti con la descrizione delle funzioni dell'utero e del corpo luteo.

Nel secondo capitolo vengono descritti gli aspetti principali delle tecniche ecografiche, le diverse tipologie (A-mode, B-mode, color Doppler) ed il loro funzionamento in ambito zootecnico.

Nel terzo capitolo vengono descritti i diversi approcci di manipolazione dell'estro nelle pecore fuori stagione riproduttiva ed in stagione riproduttiva.

1.2 ANATOMIA PICCOLI RUMINANTI

1.2.1 L'UTERO

L'utero è la parte dell'apparato genitale femminile compresa tra le tube uterine poste cranialmente e la vagina, situata caudalmente. L'utero è composto da due corna, dal corpo e dal collo. Le pecore hanno un utero bipartito. Il corpo è molto breve e le corna

si accollano per un certo tratto fino a fondersi formando un setto uterino sagittale e mediano (Figura1). Il corpo ha due facce, ventrale e dorsale; due margini, sinistro e destro; continua poi con il collo o cervice. Questa è una parete molto inspessita che delimita il canale cervicale. Nelle pecore la cervice presenta numerose pieghe circolari di mucosa chiamate anelli cervicali. (Ruggero Bortolami, et. Al 2018)

L'utero è l'organo adibito a ricevere il prodotto del concepimento e a modificarsi per portare al completo sviluppo del feto. Le caratteristiche della mucosa uterina sono legate alle fasi del ciclo estrale. Il ciclo ha 4 fasi: proestro, estro, metestro e diestro. Nelle fasi di proestro ed estro si hanno la maturazione, lo scoppio e la deiscenza del follicolo. Si osserva un aumento e una dilatazione dei vasi sanguigni, le cellule ghiandolari si moltiplicano, il collo dell'utero diventa molle e congesto, si dilata e contiene secreto mucoso. Nelle fasi di metestro e diestro c'è lo sviluppo del corpo luteo ed inizia la sua attività, le ghiandole si sviluppano notevolmente, si ha un aumento del diametro dei vasi e secrezione di trasudato negli spazi intercellulari con formazione dell'edema endometriale.

(Ruggero Bortolami, et. Al 2018)

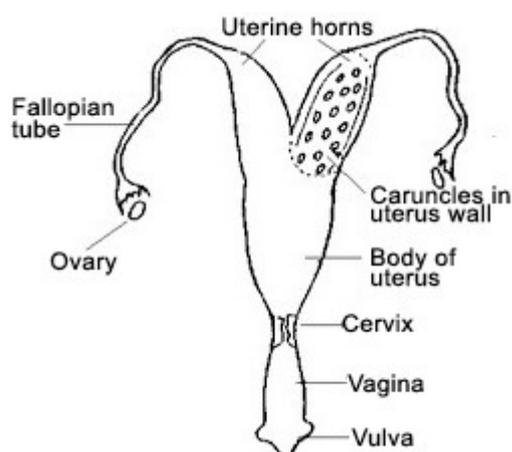


Figura 1: illustrazione del dell'apparato genitale femminile di pecora.

1.2.3. CORPO LUTEO

Dopo l'ovulazione, le cellule del follicolo scoppiato si modificano strutturalmente formando il corpo luteo, questo processo si chiama luteinizzazione. In questa fase si ha l'ipertrofia delle cellule follicolari e la loro trasformazione in un vero e proprio tessuto che produce ormoni steroidei (steroidogenico). Il corpo luteo si vascolarizza man mano che i vasi sanguigni della teca invadono la granulosa. Tutte queste modificazioni hanno la funzione di secernere nel sangue grandi quantità di progesterone insieme a piccole quantità di estrogeni, questo perché, nella fase luteinica, il progesterone è essenziale per rendere l'utero adatto all'impianto della cellula uovo fecondata. Lo sviluppo del corpo luteo avviene attraverso le modificazioni delle cellule della teca e della granulosa all'interno del follicolo nel momento dell'ovulazione. (Laurlee Sherwood, 2010)

1.2.4. FASE LUTEALE

A livello del follicolo, subito dopo l'ovulazione, inizia a formarsi il corpo luteo (il corpo emorragico), tra il terzo ed il quinto giorno il corpo luteo perde il colorito sanguigno ed aumenta di dimensioni producendo quantità di progesterone, circa a metà ciclo il corpo luteo raggiunge la dimensione massima. L'attività del corpo luteo è controllata dall'ormone luteinizzante. Il progesterone svolge due funzioni di regolazione: la prima controlla il rilascio di ormone luteinizzante inibendo le scariche di GnRH dall'ipotalamo e di conseguenza il rilascio di LH dall'ipofisi anteriore, impedendo il picco di LH e la successiva ovulazione; la seconda controlla la secrezione della prostaglandina $PGF2\alpha$ dell'endometrio, nelle pecore avviene al dodicesimo giorno del ciclo estrale, la prostaglandina completa la proteolisi e porta a termine la fase luteolinica. Quando la cellula uovo viene fecondata il corpo luteo non degenera ma continua a crescere e produrre elevate quantità di progesterone, questa struttura

ovarica dura tutta la gravidanza e viene chiamata corpo luteo gravidico e nella pecora fornisce gli ormoni essenziali per il mantenimento della gravidanza fino a quando non subentra la placenta. (Laurlee Sherwood, 2010)

1.3. TECNICHE ECOGRAFICHE

1.3.1 ECOGRAFIA

L'ecografia è un esame diagnostico non invasivo, si basa sulla trasmissione di onde sonore ad alta frequenza attraverso l'organismo e gli echi ricevuti ed analizzati da un computer forniscono un'immagine tridimensionale dell'interno di un organo, tessuti e flussi ematici (Mattoon e Nyland, 2015). **In zootecnia** gli esami ecografici sono componenti fondamentali per le diagnosi in ambito riproduttivo. Le ecografie vengono eseguite per via transrettale, sub addominale e transvaginale. Le ecografie permettono la valutazione dello stato di gravidanza, l'identificazione del feto, verificare precocemente la presenza di gravidanze gemellari che possono portare delle problematiche durante la gravidanza (tossiemia gravidica) e difficoltà al parto, patologie ovariche ed uterine nella femmina (la palpazione rettale nei piccoli ruminanti non può essere eseguita).

1.3.2 ULTRASUONI

Gli ultrasuoni sono delle oscillazioni ad andamento sinusoidale di frequenza superiore ai 20.000 Hz, ossia una frequenza superiore alla capacità delle persone di udire i suoni (i suoni udibili dall'orecchio umano presentano una frequenza compresa tra i 16 e i 20.000 Hz, mentre le frequenze inferiori ai 16 Hz sono definite come infrasuoni). Le onde usate nelle ecografie sono caratterizzate da una frequenza 1000 volte maggiore rispetto al range che l'orecchio umano può percepire. Queste onde meccaniche si

possono propagare solo attraverso un mezzo fisico deformabile (quale solido, liquido o gas, mentre non possono propagarsi nel vuoto) e portano a delle perturbazioni transitorie dello stato fisico senza che si verifichi il trasporto della materia; più nello specifico le perturbazioni transitorie dello stato fisico interessano la pressione e la densità del mezzo.

Tale mezzo fisico deformabile è composto da particelle legate tra di loro da forze di coesione elastiche che quando vengono colpite dall'onda meccanica ultrasonora si avvicinano tra di loro (fase di compressione), cedono una parte della loro energia alle particelle vicine e poi ritornano allo stato di equilibrio di partenza (fase di rarefazione); questo meccanismo si ripete poi in modo consequenziale anche con le particelle successive.

In conclusione gli ultrasuoni si propagano nel mezzo in esame sotto forma di variazioni di pressione, variazioni che determinano la formazione di bande a maggiore e a minore densità di particelle rispettivamente nella fase di pressione e nella fase di rarefazione. Per lo [studio degli organi addominali](#) si utilizzano frequenze tra i 3,3,5 e i 5 MHz, mentre per la valutazione dei tessuti superficiali vengono utilizzate frequenze più alte, dai 7,5 ai 13 MHz. **La sonda ecografica funziona sia da emittente del fascio ultrasonoro che da ricevente dell'eco.** Le onde inviate vengono infatti ricevute dai tessuti che poi, a loro volta, mandano un segnale alla sonda. Gli echi che tornano alla sonda fanno entrare in risonanza i cristalli piezoelettrici trasformando gli ultrasuoni in segnali elettrici che vengono poi elaborati dall'ecografo e trasformati in tempo reale in un'immagine che viene visualizzata. Dopo un primo impulso inviato si dovrà aspettare prima di emettere un nuovo impulso, attendendone prima la risposta. Più sono profonde le strutture da esplorare, maggiore sarà infatti il tempo di ascolto e minori gli impulsi che potranno essere inviati per unità di tempo. (Federici, et al 2020)

1.3.3. CARATTERISTICHE DELL'ONDA ULTRASONORA

L'onda ultrasonora presenta le caratteristiche tipiche di un moto oscillatorio armonico e può essere rappresentato in un grafico cartesiano come un'onda sinusoidale, dove sull'asse delle ascisse è indicato il tempo (t) e nell'asse delle ordinate vengono riportate le variazioni di pressione (P).

Le principali grandezze fisiche che caratterizzano un'onda ultrasonora sono (Figura 2):

- Lunghezza d'onda (l , più comunemente indicata con la lettera greca λ): è la distanza tra due picchi successivi di un'onda periodica. Più specificatamente può essere definita come la distanza percorsa durante un ciclo o un periodo tra due bande di compressione o di rarefazione.
- Frequenza (f): è il numero di cicli al secondo, misurabile in Hertz (Hz), ossia il numero di volte in cui si ripete una lunghezza d'onda (cicli) al secondo. 1 Hz corrisponde ad 1 ciclo/s, 1 KHz (kilohertz) è equivalente a 1.000 cicli/s ed infine 1 MHz (megahertz) corrisponde a 1.000.000 cicli/s.
- Velocità di propagazione (c): è la distanza percorsa dall'onda nell'unità di tempo, misurabile in m/s. Questo parametro è condizionato dalle proprietà fisiche del mezzo in analisi, principalmente dalla resistenza del mezzo alla compressione che a sua volta dipende dalla sua densità e dalla sua elasticità (o compattezza). La velocità media di propagazione degli ultrasuoni aumenta nei tessuti compatti e diminuisce in quelli ad alta densità, ma per quanto riguarda i tessuti biologici dell'organismo è possibile identificare una velocità media di circa 1540 m/s (ad eccezione dell'aria, del grasso e dell'osso che assumono un valore diverso). (Tabella 1)
- Periodo (T): è il tempo necessario affinché passino due compressioni successive nello stesso punto, misurabile in secondi. In altre parole può essere definito come l'intervallo temporale corrispondente alla lunghezza d'onda, poiché rappresenta il tempo in cui l'onda compie un'oscillazione completa e poi torna alla sua condizione iniziale.

- Ampiezza dell'onda (A): è l'altezza dell'onda e rappresenta la differenza tra il valore massimo dell'onda ultrasonora in fase di compressione ed il valore di equilibrio (raffigura il massimo spostamento delle molecole che compongono la materia rispetto alla loro posizione di equilibrio).
- Intensità (I): è l'energia trasportata dall'onda, che attraversa in un secondo una superficie unitaria piana perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda stessa. In altre parole, l'intensità di un'onda è la potenza trasmessa dalla sorgente di tale onda per unità di superficie, misurabile in W/cm^2 .

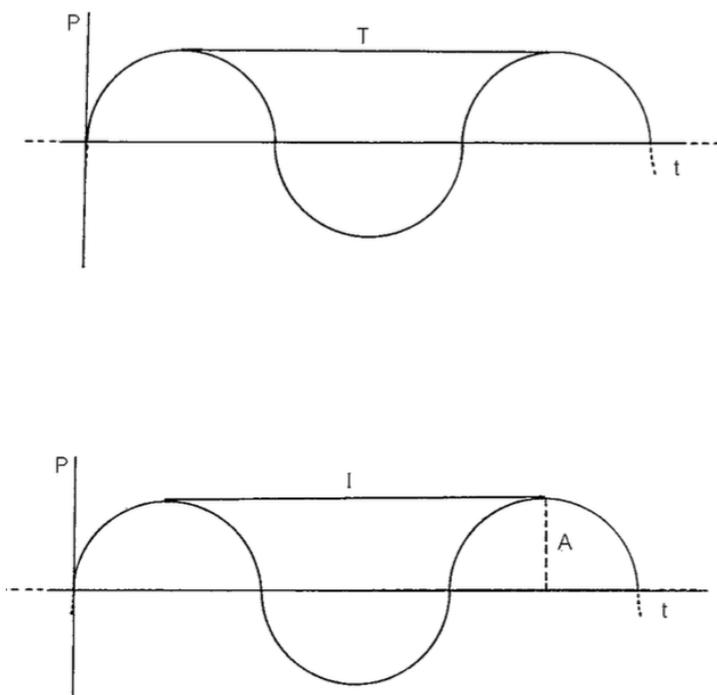


Figura 2: Rappresentazione grafica della progressione del fascio di ultrasuoni, che avviene con un andamento sinusoidale nel mezzo trasmettente. Sull'asse delle ascisse è indicato il tempo (t) e sull'asse delle ordinate la variazione di pressione (P). Nel primo grafico è rappresentato il periodo (T) misurato in secondi, mentre nella seconda rappresentazione è raffigurata la lunghezza d'onda (l) misurata in mm e l'ampiezza dell'onda (A). (Desideri, et. al 1999)

aria	331	m/s
grasso	1450	m/s
acqua	1540	m/s
tessuti molli	1540	m/s
cervello	1541	m/s
fegato	1549	m/s
sangue	1570	m/s
muscolo	1585	m/s
cristallino	1620	m/s
osso	4080	m/s

Tabella 1: Velocità di propagazione degli ultrasuoni nei tessuti (Curry, Dowdey e Murry, 1990)

Impedenza acustica:

L'impedenza acustica (Z), (unità di misura Rayl), è una caratteristica propria di ogni mezzo che descrive come esso si oppone al passaggio degli ultrasuoni, è quindi la resistenza intrinseca della materia ad essere attraversata dagli ultrasuoni.

Dipende dalla densità del mezzo e dalla velocità di propagazione delle onde sonore; si ottiene dal prodotto tra la densità tissutale (d) e la velocità di propagazione (c).

I diversi tessuti anatomici hanno tutti un'impedenza diversa e questo è il principio su cui si basano le tecniche ecografiche; per esempio il tessuto osseo ha un'impedenza acustica alta ed i gas bassa.

L'aria è meno densa e più facilmente comprimibile rispetto ai tessuti parenchimatosi e trasmette il suono ad una velocità inferiore, invece l'osso è più denso e meno comprimibile e trasmette il suono ad una velocità maggiore.

Tra due mezzi dotati di un'impedenza acustica differente si può evidenziare una superficie di separazione (interfaccia) nella quale la propagazione degli ultrasuoni subisce alcune alterazioni per effetto dei fenomeni di riflessione, rifrazione, diffusione o dispersione (Tabella 2).

aria	0,0000	× 10 ⁶ Rayls
grasso	1,38	× 10 ⁶ Rayls
acqua	1,44	× 10 ⁶ Rayls
cervello	1,54	× 10 ⁶ Rayls
fegato	1,65	× 10 ⁶ Rayls
rene	1,62	× 10 ⁶ Rayls
sangue	1,61	× 10 ⁶ Rayls
muscolo	1,70	× 10 ⁶ Rayls
cristallino	1,84	× 10 ⁶ Rayls
osso	7,8	× 10 ⁶ Rayls

Tabella 2: impedenza acustica di diversi tessuti, derivante dal prodotto tra la densità tissutale e la velocità di propagazione degli ultrasuoni (Curry, Dowdey e Murry, 1990)

La riflessione è il fenomeno per cui un'onda ultrasonora che agisce sulla superficie di separazione (interfaccia) tra due mezzi differenti non attraversa l'interfaccia ma cambia direzione di propagazione e ritorna al mezzo di partenza, per cui l'interfaccia rappresenta la superficie riflettente che rinvia gli ultrasuoni alla sonda.

Quando il fascio di ultrasuoni raggiunge perpendicolarmente l'interfaccia si ha la massima riflessione speculare e quindi tutta l'energia viene rinvia verso la sonda (Figura 3); invece se il fascio di ultrasuoni agisce sulla superficie dell'interfaccia in modo obliquo e non perpendicolare si va a generare un fascio riflesso dotato di un angolo di riflessione uguale a quello di incidenza (Figura 4).

Se l'interfaccia viene colpita con un angolo non perpendicolare ma obliquo, il fascio di onde ultrasonore subisce una deviazione superando la struttura e questo prende il nome di rifrazione. Questo fenomeno di alterazione della direzione del fascio ultrasonoro dipende dall'angolo di incidenza del fascio a livello dell'interfaccia e dalla diversa velocità di propagazione degli ultrasuoni nei mezzi in analisi.

Infine, il fenomeno della diffusione (o scattering, che deriva dal termine inglese "scatter" ossia spargimento) si verifica quando il fascio di onde incontra una superficie irregolare o tante piccole superfici orientate in modi diversi e questo porta alla diffusione del fascio in tutte le direzioni in modo casuale.

Invece il fenomeno della dispersione (o diffrazione) avviene quando il fascio ultrasonoro incontra delle particelle più piccole della lunghezza d'onda degli ultrasuoni e quindi l'energia di ritorno è estremamente bassa.

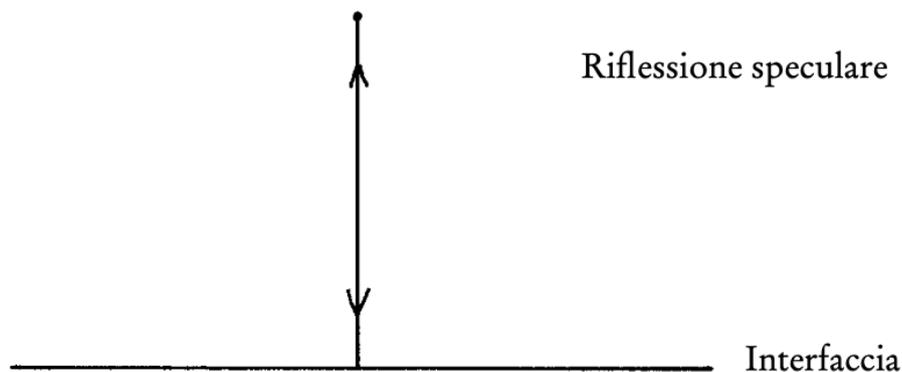


Figura 3: Rappresentazione grafica della riflessione speculare, secondo la quale tutta l'energia viene rinvia verso la sonda quando il fascio di ultrasuoni incide perpendicolarmente sulla superficie riflettente.

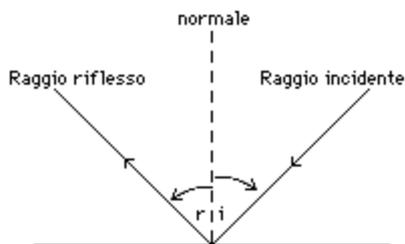


Figura 4: Rappresentazione della riflessione obliqua, secondo la quale in caso di incidenza obliqua del fascio di ultrasuoni l'eco di ritorno viene rinvia con un angolo di riflessione usuale a quello incidente.

1.3.4. APPARECCHIATURA

L'apparecchio utilizzato per questa tecnica diagnostica è l'ecografo, un dispositivo che è costituito da tre parti: un **trasduttore** (sonda) che emana onde sonore per trasmettere e ricevere il segnale, un **sistema elettronico di amplificazione**,

elaborazione e digitalizzazione; ed un sistema di visualizzazione e registrazione.

(Orlacchio A., et. al 2010)

La sonda ecografica funziona sia da emittente del fascio ultrasonoro che da ricevente, gli impulsi generati ed inviati ai cristalli piezoelettrici, i quali vibrano ed emettono ultrasuoni che vengono trasmessi ai tessuti che poi, a loro volta, mandano un segnale alla sonda. Gli echi che tornano alla sonda fanno entrare in risonanza i cristalli piezoelettrici trasformando gli ultrasuoni in segnali elettrici che vengono poi elaborati dall'ecografo e trasformati in tempo reale in un'immagine che viene visualizzata sullo schermo. Dopo un primo impulso inviato si dovrà aspettare prima di emettere un nuovo impulso, attendendone prima la risposta. Più sono profonde le strutture da esplorare, maggiore sarà infatti il tempo di ascolto e minori gli impulsi che potranno essere inviati per unità di tempo. (Orlachio A., et. al 2010)

Per eliminare l'aria tra sonda e cute che potrebbe far subire una variazione, viene utilizzato gel ecografico che favorisce **l'accoppiamento tra la sonda e la pelle**, contribuisce ad aumentare la conduttività attraverso il derma e i tessuti sottostanti. Grazie al gel gli ultrasuoni possono essere trasmessi in maniera più efficace, anche perché esso neutralizza la resistenza che l'aria oppone alla loro propagazione. (Federici, et. al 2020)

Vi sono diversi tipi di sonde ecografiche quali: **sonde meccaniche** (che utilizzano motori elettrici e in cui gli elementi attivi vibrano in un contenitore pieno di liquido), **elettroniche**, ora le più utilizzate (le emissioni degli elementi piezoelettrici vengono controllate elettronicamente), **sonde settoriali**, **sonde lineari** (ad esempio quelle utilizzate per esaminare la tiroide e che forniscono immagini rettangolari o quadrate), **sonde curvilinee** (utilizzate ad esempio per esaminare alcune parti del corpo come l'addome e che forniscono immagini triangolari, con il campo di vista vicino alla sonda che va via via ad allargarsi mentre ci si allontana da essa), **sonde anulari**, **sonde biplanari transcutanee o endocavitane**, a **bassa frequenza**, ad **alta frequenza** o

multifrequenza (capaci di emettere ultrasuoni a diverse frequenze, da scegliere in base alla migliore esecuzione dell'esame), **sonde non phased-array** e **sonde phased-array** (molto usate in ecocardiografia, con le quali è possibile variare la profondità, il numero dei fuochi ed anche l'angolo di incidenza del fascio senza dover modificare la posizione della sonda), ed anche sonde a più file di cristalli, che possono acquisire gli echi provenienti da un volume maggiore di tessuti o organi, ottimizzando il fascio e dando maggiore uniformità di focalizzazione a tutto il campo di scansione (Federici, s.d.).

1.3.5. TERMINOLOGIA ECOGRAFICA

I vari elementi biologici hanno caratteristiche ecogeniche diverse in base al loro stato fisico, I termini maggiormente utilizzati per descrivere l'aspetto delle immagini ecografiche sono:

- **Anaecogeno**: termine ecografico che descrive un'area ecopriva, ovvero una struttura in cui non si ha la produzione di echi riflessi. Questo avviene con strutture a contenuto completamente liquido, sia di tipo fisiologico (come una vescica ripiena di urina oppure i vasi sanguigni) che di tipo patologico (come la presenza di cisti) (Figura 5).



Figura 5: Raffigurazione di una lesione anecogena. L'immagine mostra un'area rotondeggiante priva di echi al suo interno con margini netti e regolari, riconducibile ad una formazione

- *Trasonico*: termine utilizzato per descrivere una struttura che si lascia attraversare liberamente dagli ultrasuoni
- *Isoecogeno* (*iso* = uguale): espressione utilizzata per indicare strutture con un'ecogenicità uguale a quella del parenchima circostante normale o degli altri organi e tessuti circostanti.
- *Ipoecogeno* (*ipo* = minore): termine utilizzato per indicare una struttura con un'ecogenicità minore, ossia una struttura in grado di produrre pochi echi quando viene raggiunta dagli ultrasuoni. Un'area ipoecogena si presenta con una colorazione grigio scuro tendente al nero, più scura rispetto ad un'area normale questo perché lascia passare gli ultrasuoni ed il livello di riflessione è ridotto. (figura 6)

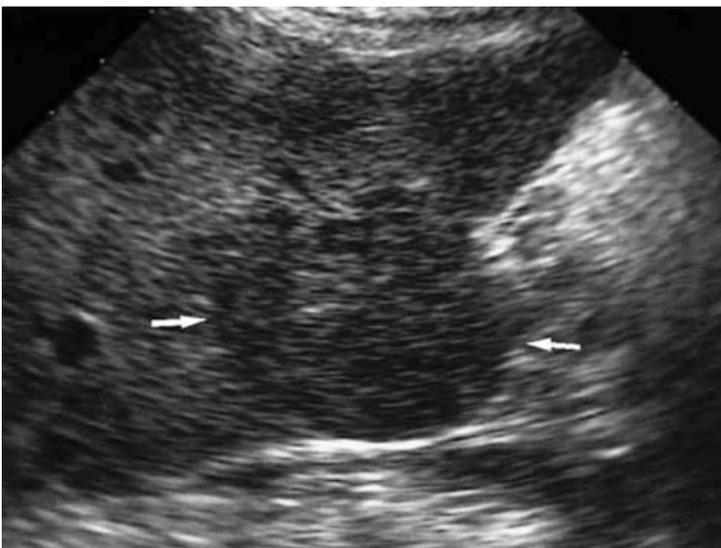


Figura 6: Raffigurazione di una lesione ipoecogena.

L'immagine rappresenta un'area rotondeggiante ipoecogena in modo omogeneo, che si distingue nettamente rispetto al parenchima circostante; riconducibile ad un adenoma nel fegato (tumore epiteliale benigno a struttura ghiandolare)

- *Iperecogeno* (*iper* = maggiore): termine utilizzato per indicare una struttura con un'ecogenicità maggiore, in grado di riflettere una notevole quantità di onde ultrasonore. Tale caratteristica è tipica delle strutture solide (come i calcoli), che nelle immagini ecografiche si presentano di un colore più luminoso (da grigio chiaro a bianco) vista la loro capacità di riflettere le onde ultrasonore. (Figura 7) (Orlacchio A, et. al 2010)

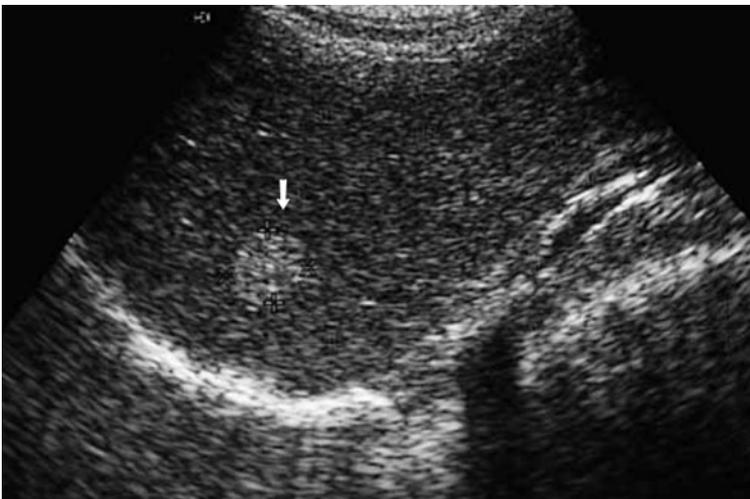


Figura 7: Rappresentazione di una lesione iperecogena. Nell'immagine si può notare un'area rotondeggiante omogeneamente iperecogena, con margini regolari e con un'ecostruttura diversa rispetto al parenchima circostante: riconducibile ad un angioma capillare.

La formazione dell'immagine ecografica finale deriva da una combinazione di echi sia diffusi che speculari prodotti dalla struttura analizzata. Il sangue o i fluidi in generale che non contengono cellule o particelle appaiono solitamente neri nelle immagini ecografiche, dato che la loro capacità di riflessione degli echi è estremamente ridotta; al contrario i liquidi dotati di una certa viscosità a causa di un aumento del quantitativo di proteine, cellule o particelle, possono invece presentare un certo grado di ecogenicità (anche se l'ecogenicità non è un indicatore affidabile della

composizione di un liquido). Gli organi parenchimatosi (come fegato e reni, dotati di un parenchima compatto) ed i tessuti sani privi di anomalie e patologie sono rappresentati nelle immagini ecografiche da diverse tonalità di grigio, senza particolari distinzioni a seconda dell'animale. Qualora però tali organi e tessuti vengono colpiti da patologie il loro livello di ecogenicità può subire delle modifiche importanti. Il tessuto adiposo normalmente è un mezzo molto ecogeno, in particolare il grasso strutturale dotato di un maggiore contenuto di tessuto connettivo. Un altro aspetto fondamentale da considerare nell'analisi delle immagini ottenute tramite ecografia (oltre all'ecogenicità delle strutture e delle sostanze anatomiche e alla diversa colorazione che queste assumono nella scala dei grigi) è l'ecostruttura dell'immagine, che fornisce informazioni sulla struttura e sulla composizione anatomica dell'organo o del tessuto analizzato. Nello specifico è estremamente importante la dimensione, la distanza e la regolarità dei punti che compongono l'immagine. I punti possono essere piccoli, medi o grandi, possono essere ravvicinati o distanti e possono avere una dimensione ed una distanza simile (ecostruttura uniforme, con punti di dimensione e distanza simile nel parenchima) oppure non eterogenea (ecostruttura eterogenea, con dimensione dei punti e distanza variabile all'interno del parenchima).

1.3.6 SISTEMI DI VISUALIZZAZIONE

I sistemi di visualizzazione si classificano in base al formato dell'immagine, che a sua volta deriva dal trasduttore utilizzato.

L'A-mode (amplitude = ampiezza) è stata la prima modalità di visualizzazione di un eco ad essere adottata, ad esempio, nei SONAR. Tale modalità viene utilizzata prevalentemente durante gli esami oculistici e per esami che richiedono una misurazione precisa di lunghezza e profondità, come nel caso della determinazione dello spessore del grasso dorsale negli animali da reddito. Il segnale inviato viene poi rappresentato su un grafico monodimensionale con variazioni di oscillazione di una

linea su un grafico, dove l'asse verticale rappresenta l'ampiezza degli echi di ritorno mentre l'asse orizzontale indica la profondità da cui deriva l'eco (infatti l'altezza dei picchi rispetto alla linea di base rappresenta l'ampiezza degli echi, invece la posizione dei picchi lungo la linea di base rappresenta la profondità da cui deriva l'eco) (Figura 8). (Medan M.S, et. Al 2010)

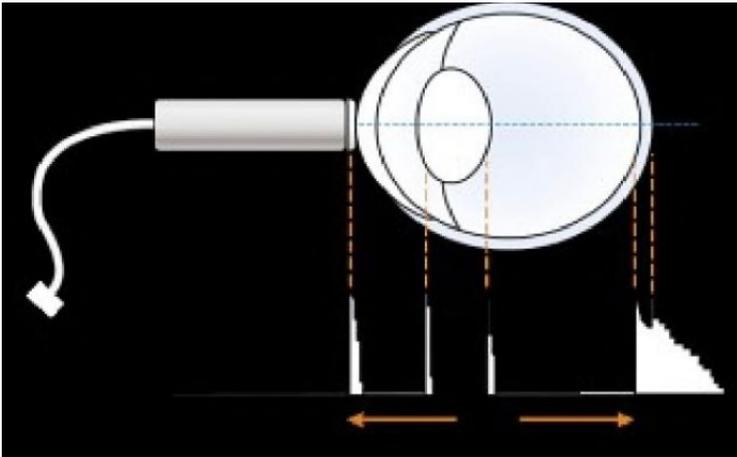


Figura 8: Raffigurazione grafica della modalità di visualizzazione degli ultrasuoni A-mode (Mattoon e Nyland, 2016)

Nella modalità B (Figura 9) (brightness = luminosità) la visualizzazione degli echi è sempre monodimensionale: gli echi vengono rappresentati in sequenza lungo una linea a seconda della loro distanza dalla sorgente (determinata sulla base del ritardo con cui ritornano alla sonda) ma la loro intensità, invece che con dei picchi, viene presentata in scala di grigi: il bianco corrisponde al massimo dell'intensità mentre il nero all'assenza di echi; le sfumature intermedie rappresentano i vari livelli di intensità. Maggiore è il numero di grigi rappresentati, maggiore è il potere di risoluzione dell'immagine. (Fausto di Tora, 2006) (Riccitelli S., 2014)



Figura 9: Raffigurazione grafica della modalità di visualizzazione degli ultrasuoni B-mode (Riccitelli S., 2014)

La risoluzione più utilizzata in ecografia è 512 x 512 (262.144 pixel) a 8 bits (255 livelli di grigio). Questa modalità di rappresentazione, utilizzata in sequenza temporale o mediante multiple linee di scansione affiancate, opportunamente sincronizzate, è la modalità di visualizzazione degli echi più utilizzata in ecografia (Fausto di Tora, 2006).

A partire dal B-Mode è possibile ottenere il B-Mode Real Time. La modalità B in Real Time è la naturale evoluzione del B-mode. Nel B-mode RT, la singola linea di scansione è affiancata a molte altre così da formare un “pennello” o un “ventaglio” che fornirà, quindi, immagini bidimensionali di sezioni di un organo o di un tessuto (immagine di tipo tomografico). Gli echi dei singoli fasci ultrasonori arrivano ai cristalli della sonda, con una sequenza opportunamente temporizzata, continuamente processati ed elaborati, così da fornire “frame” che, se in numero adeguato (almeno 15 per secondo), daranno una sensazione di “fluidità” alle immagini visualizzate sul monitor. Si otterrà, quindi, un vero e proprio video dell’organo sotto esame. In effetti, le immagini ecografiche ottenute in B-mode RT, oltre alle due dimensioni spaziali, ne possiedono una terza: il tempo. Infatti, una delle principali caratteristiche che hanno

contribuito al successo del B-mode RT è, appunto, la visualizzazione delle strutture “in tempo reale”, cioè, in maniera dinamica. Questo permette di ottenere, oltre a valutazioni di tipo morfologico, informazioni di tipo funzionale (ad esempio visualizzando le contrazioni cardiache, l’attività peristaltica intestinale, ecc.) nonché di seguire e assistere, in tempo reale, l’esecuzione di manovre interventistiche (biopsie, ago-aspirati, cateterismi, ecc.). Negli organi provvisti di movimenti continui può essere utile visualizzare questi movimenti lungo una linea di scansione fissa, soprattutto per effettuare misurazioni. Il modo M (Motion = movimento nel tempo) (Figura 10) è praticamente un B-mode in cui lungo una linea di scansione fissa si hanno continui refresh della posizione dei vari echi che, però, non vanno a sovrapporsi ai precedenti (come avviene nel B-mode RT) ma si affiancano in successione l’uno all’altro dando così informazioni sulla motilità della parte indagata lungo quella singola linea di scansione nel tempo. Questa modalità di visualizzazione è molto utilizzata in ecocardiografia. Per comprendere attraverso quale linea di scansione si sta ottenendo la sequenza, nei moderni apparecchi ecografici è possibile visualizzare contemporaneamente l’immagine in B-mode Real Time, nella quale si individua la linea di scansione, e quella in TM-mode, dove poi verranno effettuate le valutazioni e le misurazioni del caso. (Riccitelli S., 2014)

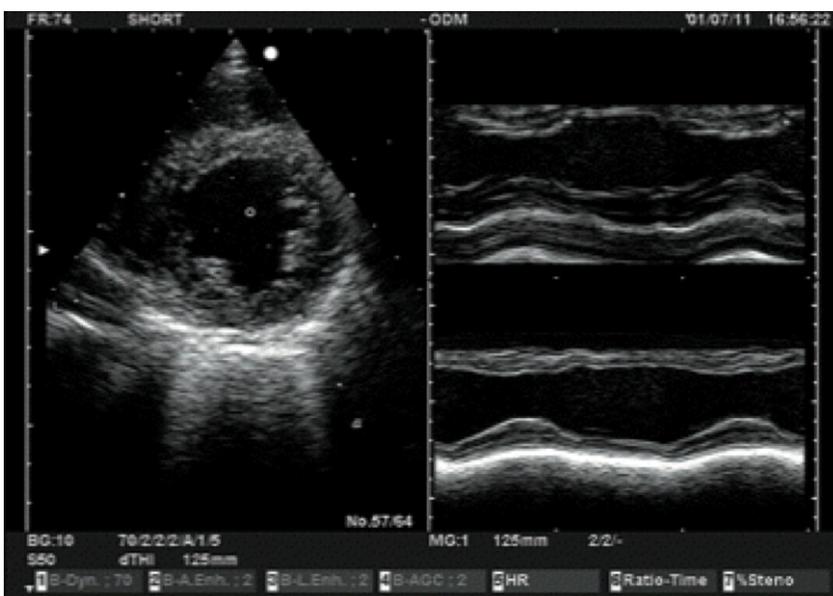


Figura 10: Rappresentazione grafica della modalità di visualizzazione degli ultrasuoni B-mode (immagine a sinistra) e M-mode (immagine a destra)
(Riccitelli S., 2014)

Più di recente si è aggiunta la modalità 3D che, se consideriamo anche il tempo, è più corretto definire 4D. La visualizzazione tridimensionale, a differenza della classica immagine fisica degli ultrasuoni e sul loro impiego in campo medico bidimensionale, è basata sull'acquisizione, mediante apposita sonda, di un "volume" della struttura in esame. Il volume da studiare viene acquisito e digitalizzato in frazioni di secondo, dopo di che può essere esaminato sia in modalità bidimensionale, analogamente al B-mode RT, con l'esame di "fette" del campione (lungo gli assi x, y e z), sia in modalità 3D, in cui l'organo da studiare appare sul monitor come un solido e può essere osservato da diversi punti di vista facendolo ruotare sui tre assi cartesiani. **Un trasduttore è un dispositivo utilizzato per convertire una forma di energia in entrata in una forma diversa di energia in uscita.** (Orlacchio A, et. al 2010). Per quanto riguarda le [ecografie](#), la sonda ecografica corrisponde ad un trasduttore che trasforma energia elettrica in energia meccanica sotto forma di ultrasuoni e viceversa, per mezzo di un effetto piezoelettrico inverso e diretto. Il suo funzionamento si basa sull'**effetto piezoelettrico** che interessa alcuni cristalli e materiali ceramici, i quali, se sollecitati dal passaggio di energia elettrica, emettono vibrazioni meccaniche, mentre quando sono sottoposti a vibrazioni meccaniche producono segnali elettrici. Nella sonda ecografica i cristalli sono protetti da una resina epossidica o di altro materiale isolante. **I cristalli, sottoposti a una pressione, generano una differenza di potenziale fra le due estremità.** Se alle estremità viene applicata una differenza di potenziale, questa provoca una deformazione del cristallo, ovvero esso aumenta o si restringe a seconda del voltaggio della corrente elettrica che lo percorre. Una corrente alternata lo fa vibrare in continuazione ad alta frequenza, producendo un ultrasuono. (Fausto di Tora, 2006)

1.3.7 ECOCOLOR DOPPLER

In particolare nella valutazione ecografica dei flussi ematici si sfrutta il così detto effetto Doppler, fenomeno fisico per cui la frequenza dell'onda che incontra i corpi in movimento (gli eritrociti del sangue), subisce una variazione proporzionale alla velocità dei corpi stessi. L'onda quindi modificata (onda riflessa), viene captata dalla sonda ecografica. (Nolsøe CP et. al 1991)

A questo punto l'apparecchio mette a confronto la frequenza dell'onda pre-interazione con quella riflessa o post-interazione e ne misura la differenza; da questa misurazione è possibile risalire alla velocità del sangue ed alla direzione del flusso ematico (Figura 11). (Marsal 1993)

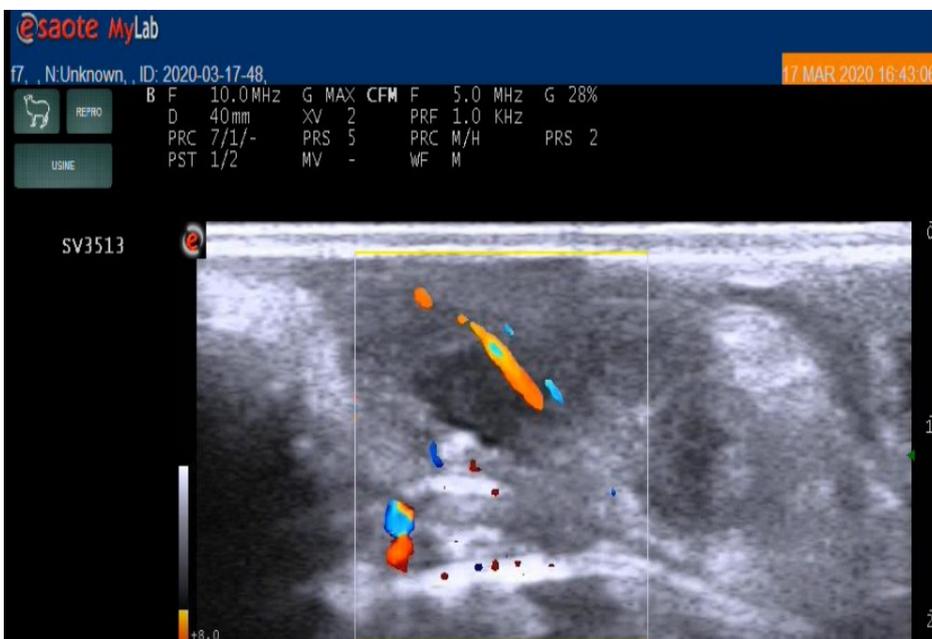


Figura 11: screenshot di ecocolour doppler di un corpo luteo di pecora, si può osservare la vascolarizzazione.

Il termine Color (Ecocolor Doppler) si riferisce al fatto che la direzione del flusso viene visualizzato nell'immagine ecografica attraverso dei colori. Per convenzione, i flussi in avvicinamento hanno colore rosso e quelli in allontanamento hanno colore blu. (Nolsøe CP, et al. 1991)

I due tipi di sistemi Doppler attualmente in uso sono il Doppler a onda continua e il Doppler a onda pulsata. Il doppler a onda continua incorpora due cristalli piezoelettrici separati: un cristallo emette continuamente onde e l'altro riceve continuamente le onde riflesse. Il vantaggio di questo sistema è che è in grado di

misurare velocità del flusso sanguigno molto elevate. Uno svantaggio è che non c'è selezione della profondità e che tutte le frequenze si spostano e quindi tutto il flusso sanguigno in tutti i vasi all'interno della gamma del fascio di ultrasuoni viene ripreso (Marsal, et. al 1993).

Con il sistema Doppler a onde pulsate, invece, è possibile selezionare la profondità alla quale viene ricevuto lo spostamento Doppler e il flusso sanguigno in vasi specifici può essere valutato in modo selettivo. In questo sistema, gli stessi cristalli piezoelettrici emettono e ricevono alternativamente le onde ultrasoniche. L'onda Doppler è costituita solo da singoli segmenti a causa del modello alternato di emissione e ricezione delle onde. Per ricostruire accuratamente la forma d'onda dai singoli impulsi, la frequenza del polso deve essere doppia rispetto alla frequenza Doppler, che limita la velocità massima rilevabile (Dickey, et al. 1997).

La modalità (power) doppler è un metodo più nuovo e avanzato per l'imaging del flusso sanguigno (Fig. 3). Contrariamente ai metodi convenzionali, che misurano la velocità del flusso sanguigno, questa tecnica misura l'intensità del flusso sanguigno, ovvero il numero di globuli rossi che si muovono attraverso un vaso per unità di tempo. I globuli sono visti come focolai colorati proiettati sull'immagine (Dudwiesus, et al. 1995). Rispetto alle tecniche convenzionali color Doppler, questo metodo è superiore per l'imaging di un flusso sanguigno molto basso (Bude et al. 1994; Ginther e Matthew, 2004).

L'ecografia color-doppler transrettale è stata utilizzata negli ultimi anni per valutare la perfusione ovarica, in particolare il flusso sanguigno luteale e follicolare (Acosta et al. 2002, 2003, 2005; Miyamoto et al. 2005, 2006).

Sono stati studiati i cambiamenti associati al ciclo nel flusso sanguigno luteale utilizzando l'ecografia color Doppler transrettale (Baumgartner 1998). Il numero massimo di pixel di colore sull'area della sezione trasversale del corpo luteo era correlato ai cambiamenti associati al ciclo nella concentrazione di progesterone

plasmatico e ai cambiamenti morfologici nel corpo luteo, come determinato dall'ecografia B-mode. (Figueira, 2015)

L'ecocolor doppler è stata usata per studiare il funzionamento fisiologico del corpo luteo nelle pecore di Santa Ines, accostando le immagini catturate con ecocolor doppler e le immagini prodotte dall' ecografia B-mode (tipologia classica). In questa ricerca si è visto che la vascolarizzazione del corpo luteo inizia ad aumentare dopo il quarto giorno dall'ovulazione ed è associata al crescente livello plasmatico del progesterone ed è per questo che l'uso dell'ecocolor doppler è utile per valutare la funzionalità del corpo luteo nelle pecore. La relazione tra vascolarizzazione e funzionalità del corpo luteo si può osservare anche nel periodo di luteolisi in cui si osserva la diminuzione della vascolarizzazione e della concentrazione del progesterone. Il flusso di sangue nell'area luteale è un indicatore più affidabile della funzionalità del corpo luteo rispetto alle sue dimensioni; l'uso dell'ecocolor doppler può diminuire gli errori di valutazione rispetto l'ecografia B-mode di una regressione precoce del corpo luteo. Nei piccoli ruminanti l'ecocolor doppler semplifica l'identificazione delle strutture ovariche come ad esempio le ovaie rispetto all'uso dell'ecografia B-mode che può rendere più complicata la rilevazione di queste parti anatomiche (Figueira, et al. 2015).

In un altro studio vengono messe in relazione ecocolor doppler, ecografia B-mode e la misurazione del progesterone per determinare la risposta ovarica in pecore superovulate. Questo studio ha portato alla luce l'utilità dell'accostamento tra ecocolor doppler e ecografia B-mode per identificare il corpo luteo e i follicoli anovulatori. Per l'identificazione delle ovaie furono usate entrambe le tecniche ecografiche tramite un'ecografia transrettale. (Oliveira, et al. 2018)

L'identificazione dei corpi lutei con la metodologia B-mode può essere facilmente sovrastimata, accostando a questa l'ecocolor doppler si può avere una maggiore accuratezza. (Oliveira, 2018)

Uno studio ha evidenziato come l'ecocolor doppler sia un ottimo strumento per identificare le gravidanze precoci nelle pecore osservando la vascolarizzazione dei tessuti luteali. Ha poi dimostrando che la vascolarizzazione del corpo luteo può essere valutata con una scala soggettiva da 1-4 gradi di vascolarizzazione, da moderato ad alto, in cui lo score 1 identifica gli animali non gravidi. (Eduardo Kenji Nunes Arashiro, 2018)

È possibile osservare la distribuzione del flusso sanguigno nelle regioni del follicolo in maniera più completa, accostando le immagini ecografiche 2D a software di modellazione 3D. Nei bovini e nelle altre specie domestiche questa nuova metodologia non invasiva permette di valutare la vascolarizzazione dei follicoli e del corpo luteo. (E.K.N. Arashiro, 2013)

1.4. MANIPOLAZIONE DEL CICLO ESTRALE:

1.4.1 STAGIONALITÀ:

Le pecore sono animali poliestrali stagionali, il che significa che esibiscono estro ed ovulazione spontanei durante i periodi di breve luce diurna (stagione riproduttiva) ma non durante i periodi di lunga luce diurna (fuori stagione). Poiché la durata della loro gestazione è di 5 mesi, le pecore possono avere solo uno o due agnelli all'anno. Questo fattore limita la produttività individuale e la redditività di ciascun animale. Il numero di colture di agnelli per individuo può essere aumentato a 3 ogni 2 anni o a 5 ogni 3 anni se le femmine rimangono incinte al di fuori della stagione riproduttiva. Per stimolare le pecore e per mostrare l'estro e l'ovulazione al di fuori della stagione riproduttiva, gli allevatori possono utilizzare tecniche per la sincronizzazione dell'estro. Però bisogna tener conto che sia il tasso di ovulazione che il tasso di gravidanza diminuiscono fuori stagione. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, 2020)

Le pecore come già detto, sono animali poliestrali stagionali. Ciò significa che si verificano cicli spontanei regolari durante i periodi di luce diurna decrescente o breve (dall'inizio dell'autunno a fine inverno). Le pecore entrano in anestro durante i periodi di luce diurna crescente o prolungata (dall'inizio della primavera a fine estate). All'aumentare della luce del giorno si verifica una ridotta secrezione di melatonina, che si traduce in un aumento del rilascio di dopamina dai neuroni dopaminergici nell'area retrochiasmatica dell'ipotalamo. L'aumento della secrezione di dopamina inibisce la kisspeptina dal nucleo arcuato nell'ipotalamo, con conseguente inibizione della secrezione GnRH (ormone di rilascio delle gonadotropine). Durante questo periodo l'attività ovarica è statica, le concentrazioni di estradiolo-17 β rimangono basse, tutto questo attiva il sistema neurale inibitorio responsivo all'estradiolo-17 β nel cervello e inibisce la frequenza degli impulsi di GnRH e LH. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, 2020)

Con la diminuzione della luce solare, la luce ultravioletta viene trasmessa attraverso la retina al nucleo soprachiasmatico e al ganglio cervicale superiore, portando ad un aumento della secrezione di melatonina dalla ghiandola pineale. La melatonina inibisce i neuroni dopaminergici inibitori ipotalamici, con conseguente diminuzione della sensibilità ipotalamica all'estradiolo-17 β . Ciò stimola il rilascio di kisspeptina nei nuclei ipotalamici arcuati e preottici, stimolando la secrezione di GnRH, LH e FSH. La secrezione di FSH stimola lo sviluppo follicolare e aumenta la secrezione di estradiolo-17 β , all'aumentare dell'ormone la sensibilità ipotalamica diminuisce e rilascia il GnRH che a livello ipofisario stimola il rilascio di LH e FSH, culminando nel picco di LH.

(Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. al 2020)

La prima ovulazione della stagione riproduttiva si verifica subito dopo il picco di LH, ma la formazione del corpo luteo è caratterizzata da una fase luteale significativamente ridotta con una produzione minima di progesterone. Questo processo è il risultato della regolazione dei geni coinvolti nella sintesi del progesterone (p. es., proteina regolatrice acuta steroidogenica, 3 β -idrossisteroide

deidrogenasi e fattore di crescita endoteliale vascolare). La seconda ovulazione della stagione riproduttiva è caratterizzata da una fase luteale di lunghezza normale, ma il comportamento estrale nel periodo dell'ovulazione è carente (silenzioso) a causa dell'insufficiente innesco del progesterone. Di conseguenza, l'accoppiamento naturale con la successiva gravidanza non può avvenire fino al terzo ciclo estrale della stagione a meno che non venga utilizzata l'integrazione di progesterone. A differenza del periodo fuori stagione, l'inibitore della frequenza del rilascio di GnRH e LH durante la stagione riproduttiva è il progesterone. Alla fine del diestro la secrezione di GnRH e LH aumenta, il che innesca il successivo picco di LH e l'ovulazione. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. al 2020)

1.4.2 EFFETTO MASCHIO:

L'introduzione di un nuovo maschio di montone ("effetto maschio o becco") nelle pecore può innescare un aumento di LH attraverso una serie di stimolazioni neuroendocrine dell'ipotalamo e della ghiandola pituitaria. I feromoni sessuali, prodotti dalla ghiandola sudorifera del montone, agiscono sui recettori del bulbo olfattivo della pecora, stimolando i neuroni dei nuclei ventromediali e arcuati dell'ipotalamo, portando ad un aumento della secrezione di kisspeptina e all'inizio dell'estro. La risposta ai feromoni sessuali di un nuovo maschio può persino superare l'effetto inibitorio del progesterone tranne che nella fase medioluteale. Tuttavia, il comportamento estrale e le risposte dell'ovulazione ai feromoni sessuali di un nuovo maschio possono variare tra le pecore. (Graeme B Martin, et. al 1986)

L'introduzione di un nuovo maschio può anche innescare un aumento di LH che induce l'ovulazione nelle pecore. (J.E Romano, 2000) Anche se l'induzione dell'estro dal feromone sessuale maschile nelle pecore in anestro è efficace, simile alla prima

ovulazione della stagione riproduttiva, il comportamento estrale è silenzioso e l'ovulazione è seguita da una fase luteale ridotta. È importante notare che lo stadio dell'anestro può influenzare la risposta femminile ai feromoni sessuali maschili, in modo tale che il tasso di induzione dell'estro sia inferiore nell'anestro iniziale rispetto all'anestro tardivo. (Graeme B Martin, 1986) (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. al 2020)

Nei ruminanti, l'esposizione a un progestinico è necessaria sia per le espressioni del normale comportamento estrale che per la normale funzione luteinica dopo l'ovulazione. La percentuale di pecore fuori stagione che mostrano un comportamento estrale è più alta dopo il trattamento con progestinici e l'effetto maschio rispetto al solo effetto becco. La somministrazione di progestinici, prima di esporre le pecore fuori stagione a un nuovo maschio, non solo aumenta l'induzione del normale comportamento estrale e dell'ovulazione, ma provoca anche una gravidanza delle femmine accoppiate. Di conseguenza, è comune utilizzare progestinici in combinazione con il feromone sessuale maschile per migliorare le prestazioni riproduttive fuori stagione. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. al 2020)

L'uso di progestinici non è l'unico modo per migliorare l'effetto dei feromoni sessuali maschili. La somministrazione di FSH con progestinici aumenta la risposta di induzione dell'estro nelle pecore fuori stagione rispetto alle pecore fuori stagione esposte solo a nuovi montoni. (Graeme B Martin, et. al 1986)

1.5 INDUZIONE E SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO DURANTE LA STAGIONE RIPRODUTTIVA

1.5.1 TRATTAMENTO CON PROGESTINICI

Il trattamento con progestinici (forme naturali o sintetiche di progesterone) è un metodo comune per la sincronizzazione dell'estro nei piccoli ruminanti. La somministrazione di progestinici per 11 giorni determina un ritorno al calore in 2 giorni dopo la sospensione del progesterone (A. Menchaca, et al. 2007). Pecore trattate con Flurogestone acetato con spugnetta intravaginale o impianto subcutaneo (dose 35 mg) per 11 giorni in combinazione con l'introduzione di montone hanno dimostrato un comportamento estrale maggiore. La riduzione della quantità di progestinici o la riduzione della durata del trattamento da 11 a 6 giorni non influenza negativamente lo sviluppo follicolare e l'ovulazione durante la stagione riproduttiva. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. Al 2020)

1.5.2 TRATTAMENTO CON PGF2A

Il PGF2 α (prostaglandina F2 α) è prodotto dalle ghiandole endometriali in risposta all'ossitocina per causare la luteolisi alla fine della fase luteale quando non c'è gravidanza. Nelle pecore, questo processo si verifica rispettivamente dal giorno 11 al giorno 12 dopo l'estro. La somministrazione intramuscolare di PGF2 α o di un analogo sintetico indurrà la lisi prematura dei corpi lutei durante il diestro e accelererà l'inizio dell'estro e dell'ovulazione. PGF2 α è inefficace nella sincronizzazione dell'estro quando somministrato durante una fase del ciclo estrale in cui i corpi lutei non rispondono al PGF2 α (p. es., metestro, proestro, estro). Tuttavia, un secondo trattamento con PGF2 α (15 mg.) da 9 a 10 giorni dopo il trattamento iniziale provoca l'induzione dell'estro nelle pecore con efficienza minore rispetto al trattamento con una spugnetta intravaginale o impianto per 11 giorni. Inoltre, è importante ricordare che la velocità di parto è ridotta dopo la somministrazione di 2 iniezioni di PGF2 α . (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. Al 2020)

1.6 INDUZIONE E SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO FUORI STAGIONE RIPRODUTTIVA

1.6.1 TRATTAMENTO CON PROGESTINICI

Come menzionato prima, l'introduzione di un nuovo maschio da solo può indurre l'ovulazione nelle pecore in anestro, ma non è sufficiente a provocare un comportamento estrale con una successiva fase luteale normale. Un precedente trattamento con progestinico può superare questo problema. Le pecore trattate con Flurogestone acetato prima dell'introduzione dell'ariete hanno un tasso di induzione dell'estro significativamente più alto rispetto alle pecore in anestro esposte ai soli feromoni sessuali maschili. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. al 2020)

L'aggiunta di FSH (ormone follicolo stimolante) o PMSG (una gonadotropina con attività simile all'FSH) al protocollo di induzione dell'estro aumenta i tassi di risposta fuori stagione. L'iniezione di 300 U.I. di PMSG (Gonadotropina corionica equina) subito dopo la rimozione della spugnetta intravaginale aumenta il tasso di ovulazione. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et. al 2020)

1.6.2 TRATTAMENTO CON PGF2A

L'induzione dell'estro non si verificherà con l'uso PGF2 α durante l'anestro perché non c'è tessuto luteale. Tuttavia, l'uso di 2 iniezioni di PGF2 α (D-Cloprostenolo; 0,15 mg a 10 giorni di distanza) in combinazione con GnRH (4,2 μ g [buserelin]) prima della prima iniezione di PGF2 α comporta un tasso di parto più elevato nelle pecore fuori stagione. (J.P.C. Greyling, et al. 1991)

1.6.3 TRATTAMENTO CON GONADOTROPINE

L'uso di gonadotropine, con introduzione di progestinici e montone, è necessario per massimizzare il tasso di gravidanza nelle pecore fuori stagione. L'FSH è un ormone

gonadotropico prodotto dall'ipofisi anteriore che agisce sui recettori all'interno delle cellule della granulosa ovarica. Somministrato durante la stagione riproduttiva, l'FSH induce la superovulazione. La somministrazione di FSH (200 mg) alle pecore durante la stagione riproduttiva comporta un tasso di ovulazione più elevato con un numero maggiore di embrioni trasferibili. La somministrazione di un dosaggio più elevato di FSH può provocare una diminuzione di fertilità per mancato impianto dell'embrione nella parete dell'utero. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et al. 2020)

Durante la gestione dell'allevamento fuori stagione, una singola iniezione di FSH (Folltropin 68 mg) 12 ore prima della sospensione dei progestinici (0,3 g di progesterone [CIDR-G]) e dell'introduzione dell'ariete determina solo un piccolo aumento del tasso di ovulazione rispetto a una singola iniezione di FSH 36 ore prima dei progestinici e all'introduzione dell'ariete nelle pecore fuori stagione. Il trattamento delle pecore in anestro con una singola iniezione di FSH (55 mg) 24 ore prima della sospensione della CIDR determina una gravidanza con tasso maggiore rispetto alle pecore che non ricevono alcun trattamento. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, et al. 2020)

Il PMSG è un ormone gonadotropico prodotto dalle coppe endometriali nelle cavalle gravide da 45 a 100 giorni di gestazione. Simile all'FSH, il PMSG agisce sui recettori delle cellule della granulosa ovarica per indurre l'estro nelle pecore. Negli ovini sono stati utilizzati dosaggi variabili di PMSG (Hoppen, H.O, 1994). La somministrazione di 500 U.I. PMSG alle pecore fuori stagione, dopo la rimozione del trattamento con progestinico e l'esposizione agli arieti, ha aumentato i tassi di gravidanza rispetto alla sola esposizione agli arieti. Somministrando 400 U.I. di ePMSG o 200 U.I., 24 ore prima della rimozione del progestinico (spugna di fluorogestone acetato; 5 giorni), aumentano in ugual misura i tassi di fertilità rispetto a 100 U.I. Inoltre, le dimensioni della cucciolata sono più elevate con 400 UI di PMSG durante la bassa stagione. Le molecole di PMSG a causa della loro differenza di dimensioni rispetto a quelle della

pecora, provoca una reazione immunitaria del sistema ovarico ed una volta somministrato si dovrà aspettare 6 mesi per avere l'effetto desiderato alla prossima somministrazione. (Hayder Mohammed Hassan Habeeb, 2020)

1.6.4 TRATTAMENTO CON β -NGF

Il β -NGF (fattore di crescita neuronale beta) che è presente nel plasma seminale maschile esercita potenti effetti ovulatori e luteotrofici dopo la somministrazione sistemica nei camelidi ma anche in altre specie. (P. Tribulo, 2015)

Diversi studi indicano che il fattore di crescita neurale beta (β -NGF) è coinvolto nella regolazione fisiologica del seme, della funzione ovarica e dello sviluppo concezionale in diverse specie. (V.M. Tanco, 2012) L'applicazione di β -NGF purificato ottenuto dal plasma seminale di lama ha dimostrato di esercitare un potente effetto ovulatorio e luteotrofico quando somministrato per via intramuscolare (im) o intrauterina nei lama. I lama trattati con β -NGF mostrano un diametro del corpo luteo (CL) migliorato e una maggiore produzione di P4 rispetto a quella di un dato plasma seminale intero o GnRH. (G. Gajardo, 2021)

Uno studio eseguito su manze da latte ha dimostrato che l'uso di β -NGF nei protocolli di sincronizzazione dell'estro migliora la funzione luteale, aumenta le aree vascolarizzate del corpo luteo e la concentrazione di progesterone. (G. Gajardo, 2021)

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi si concentra sullo studio della metodologia usata. Cioè vedere se è possibile utilizzare il programma di analisi ImageJ per misurare oggettivamente e soggettivamente l'area vascolarizzata dei corpi lutei e se è fattibile ottenere un punteggio della vascolarizzazione nella valutazione soggettiva congruente a quella oggettiva. Queste valutazioni vengono fatte indipendentemente dalla somministrazione di PMSG.

Un altro scopo è osservare se il trattamento con PMSG influenza la vascolarizzazione, il volume dei corpi lutei, intensità dei pixel e se esiste una relazione tra vascolarizzazione ed intensità di grigi. Infine vedere se c'è relazione tra intensità di pixel e la presenza o meno di cavitarietà nel corpo luteo.

3.MATERIALI E METODI

In questo studio sono state analizzate immagini ecografiche dei corpi lutei di pecore di razza Kivircjk fuori stagione riproduttiva. Centoventi pecore sono state divise random in gruppi. Tutte sono state sottoposte a sincronizzazione dell'estro con progestinici attraverso spugnetta intravaginale per 11 giorni. Alle pecore immediatamente dopo la rimozione della spugnetta sono state somministrate, per via intramuscolare, diverse sostanze. I gruppi sono stati costituiti somministrando a pecore 350 o 400 U.I. di PMSG con 100 o 250 U.I. di NGF(350NGF, 400NGF) o senza NGF (350, 400), per quelle che non hanno ricevuto nessuna somministrazione (control) e quelle con la sola somministrazione di 100 o 250 U.I. di NGF (NGF). Per questo studio sono state analizzate le ecografie di 95 su 120 soggetti per osservare l'influenza che il PMSG ha sulla vascolarizzazione complessiva dei corpi lutei delle pecore e per vedere se l'intensità dei grigi abbia una relazione con la vascolarizzazione del corpo luteo.

3.2 METODO DI UTILIZZO DEL PROGRAMMA IMAGEJ: NOZIONI DI BASE E COMANDI UTILI PER L'ANALISI DELLE IMMAGINI ECOGRAFICHE

3.1.1 TIPOLOGIE DI IMMAGINI

Tutte le immagini digitali sono composte da pixel, ossia singoli componenti più piccoli delle immagini che costituiscono le unità minime d'informazione luminosa e contengono valori numerici che vanno dal bianco al nero (intensità di pixel).

Ogni pixel è composto da un determinato numero di bit; tale numero di bit con il quale viene rappresentato ogni singolo pixel è definito come profondità di colore dell'immagine.

In termini di bit per pixel (bpp) i tipi di immagine di cui ImageJ si occupa sono:

- 8 bit: immagini che possono visualizzare 256 (2^8) livelli di grigio; questa rappresenta la risoluzione più utilizzata in ambito ecografico
- 16 bit: immagini che possono visualizzare 65.536 (2^{16}) livelli di grigio
- 32 bit: immagini che possono visualizzare 4.294.967.296 (2^{32}) livelli di grigio
- Colori RGB: immagini a colori a 24 o 32 bit che possono visualizzare 256 valori nel canale rosso (Red), verde (Green) e blu (Blue).

Barra degli strumenti:



- | | | | |
|---|--|----|------------------------|
| 1 | Rectangular Selection Tool and Rounded Rectangular Selection Tool | 8 | Wand Tool |
| 2 | Oval Selection Tool, Elliptical Selection Tool and Brush Selection Tool | 9 | Text Tool |
| 3 | Polygon Selection Tool | 10 | Magnifying Glass |
| 4 | Freehand Selection Tool | 11 | Scrolling Tool |
| 5 | Straight Line Selection Tool, Segmented Line Selection Tool, Freehand Line Selection Tool and Arrow Tool | 13 | <i>More Tools</i> Menu |
| 6 | Angle Tool | | |
| 7 | Point Tool and Multi-point Tool | | |

La barra degli strumenti di ImageJ contiene strumenti utili per selezionare, disegnare, zoomare, scorrere, etc.

Le icone 1, 2, 3 e 4 hanno la funzione di selezionare una specifica area d'interesse e rappresentano rispettivamente uno strumento di selezione rettangolare "*Rectangular selection tool*", uno strumento di selezione circolare "*Oval selection tool*", uno strumento di selezione a forma poligonale "*Polygon selection tool*" (questo consente di creare selezioni di forma irregolare composte da una serie di segmenti in linea) ed infine uno strumento di selezione a mano libera "*Freehand selection tool*" che permette all'utente di disegnare in autonomia la sezione da analizzare.

Invece l'icona 5 "*Straight line selection tool*" rappresenta uno strumento di selezione a linea retta, l'icona 6 "*Angle tool*" consente di misurare un angolo definito da tre punti; l'icona 7 "*Point tool*" permette di creare una selezione di punti nell'immagine da selezionare (utile per contare diversi elementi o per registrare le coordinate dei pixel) e l'icona 8 "*Wand tool*" permette di selezionare oggetti o elementi di colore uniforme.

Oltre a questi elementi di analisi, esistono anche comandi più generali come l'icona 9 "Text tool" che consente di inserire annotazioni, frasi e lettere nell'immagine in analisi, l'icona 10 "Magnifying glass" che consente di zoomare l'immagine, oppure l'icona 11 "Scrolling tool" che consente di spostarsi all'interno dell'immagine mantenendo lo stesso livello di ingrandimento della figura.

A questi comandi se ne aggiungono altri (icona 13 "More tools menu"), selezionabili dall'utente in base alle sue necessità ed in base al tipo di immagine che deve analizzare.

3.1.2 COMANDI DEL MENÙ



La barra dei menù compare una volta aperto il programma informatico ed elenca tutti i comandi di ImageJ.

Questi comandi generali sono organizzati in otto menù:

- 1. File:** permette di compiere operazioni di base sui file, come apertura, salvataggio in diversi formati, importazione, stampa e creazione di nuove immagini.
- 2. Edit:** permette di compiere operazioni di modifica e disegno, eliminazione del colore di sfondo ed eliminazione dell'area al di fuori dell'elemento selezionato nell'immagine; nonché impostazioni globali come taglia, copia e incolla.
- 3. Image:** permette di convertire e modificare le immagini. Questo comando è composto a sua volta da un sottomenu estremamente ampio che consente di determinare il tipo di immagine attiva o modificarla in un'altra tipologia di immagine (8 bit, 16 bit, 32 bit o RGB), consente di regolare la luminosità, il contrasto di colori, i livelli di soglia e le dimensioni dell'immagine. Inoltre permette di visualizzare e impostare varie proprietà dell'immagine, duplicare, zoomare e trasformare l'immagine.

- 4.** Process: consente di elaborare le immagini e comprende anche le operazioni sui punti, i filtri e le operazioni aritmetiche tra più immagini.
 - 5.** Analyze: permette di effettuare misurazioni statistiche sui dati dell'immagine, consente la creazione di istogrammi ed altre operazioni relative all'analisi delle immagini.
 - 6.** Plugins: questa sezione della barra del menù contiene comandi per la creazione, la modifica e la gestione dei componenti aggiuntivi.
 - 7.** Window: permette la selezione e la gestione delle finestre aperte.
- Help: questa sezione riguarda gli aggiornamenti e le informazioni generali sulla versione del programma.

3.1.3 CREAZIONE DELL'ISTOGRAMMA

Per effettuare l'analisi della tessitura ecogenica delle diverse regioni anatomiche d'interesse è fondamentale la creazione di un istogramma.

L'istogramma è un grafico bidimensionale che riporta sull'asse x il numero di valori del livello di grigio (ossia la scala di grigi) e sull'asse y la frequenza dei pixel (ovvero la quantità di pixel presenti all'interno dell'immagine per quel determinato livello di grigio), quindi consente di avere una lettura immediata, obiettiva e scientifica della luminosità dell'immagine e della qualità del contrasto.

Tale rappresentazione grafica mediante diagramma raffigura in maniera schematica in che modo sono distribuiti i pixel scuri e luminosi in un'immagine digitale, in quanto in ciascuna immagine ogni singolo pixel ha una specifica luminosità a cui viene attribuito un valore numerico compreso tra 0 e 255 (dove 0 corrisponde al nero e 255 al colore bianco).

Lungo l'asse orizzontale viene mostrato il numero dei pixel per ciascun valore tonale; partendo da sinistra si hanno i valori relativi alle ombre, ai mezzi toni e alle luci (infatti

all'estrema sinistra si ha il nero perfetto mentre all'estrema destra si ha il bianco perfetto).

3.1.4 METODO DI ANALISI DELLE IMMAGINI ECOGRAFICHE

Per avere l'immagine del corpo luteo sono stati eseguiti gli screenshot dei video ecografici, una volta fatti sono state analizzate le ecografie. Per alcuni soggetti non è stato possibile l'identificazione del corpo luteo.

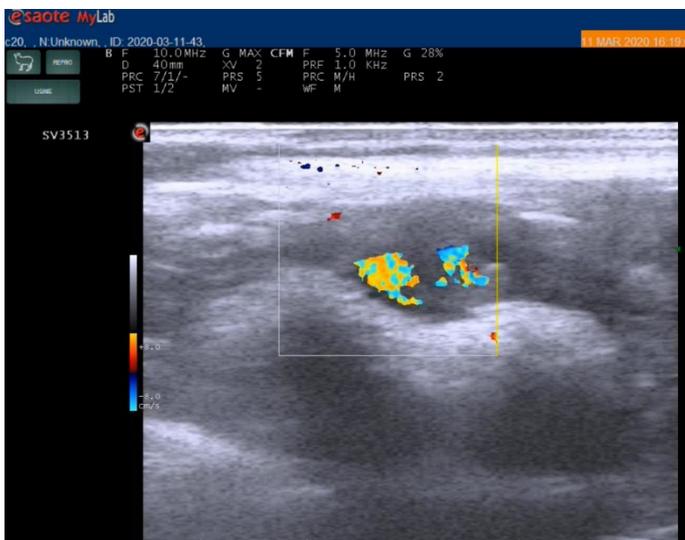
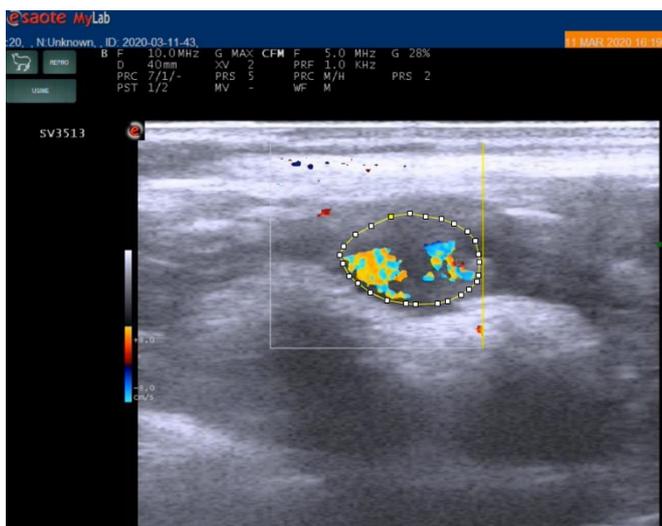


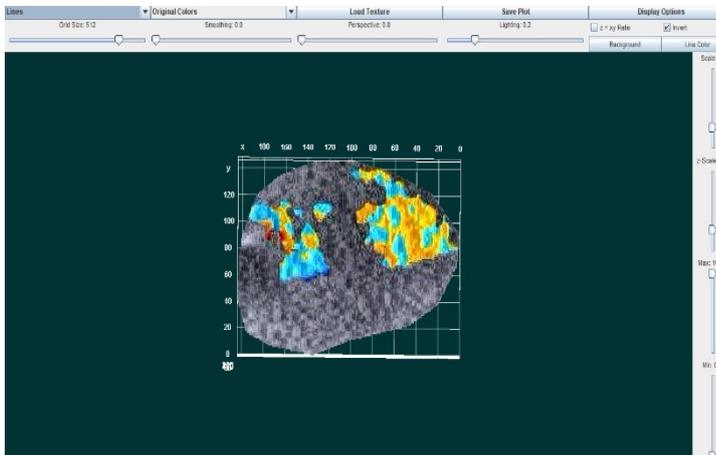
Figura 11: ecocolor doppler del corpo luteo

Le immagini ecografiche analizzate sono state effettuate per via transrettale usando l'ecocolor Doppler ed ecografia B-mode, con frequenza variabile (5-10 MHz) mediante l'utilizzo di un ecografo ad array lineare lineare (FIG.11).



Le immagini ecografiche sono state analizzate al computer con il software ImageJ.exe, delineando la superficie del corpo luteo tramite la funzione poligono (FIG.12).

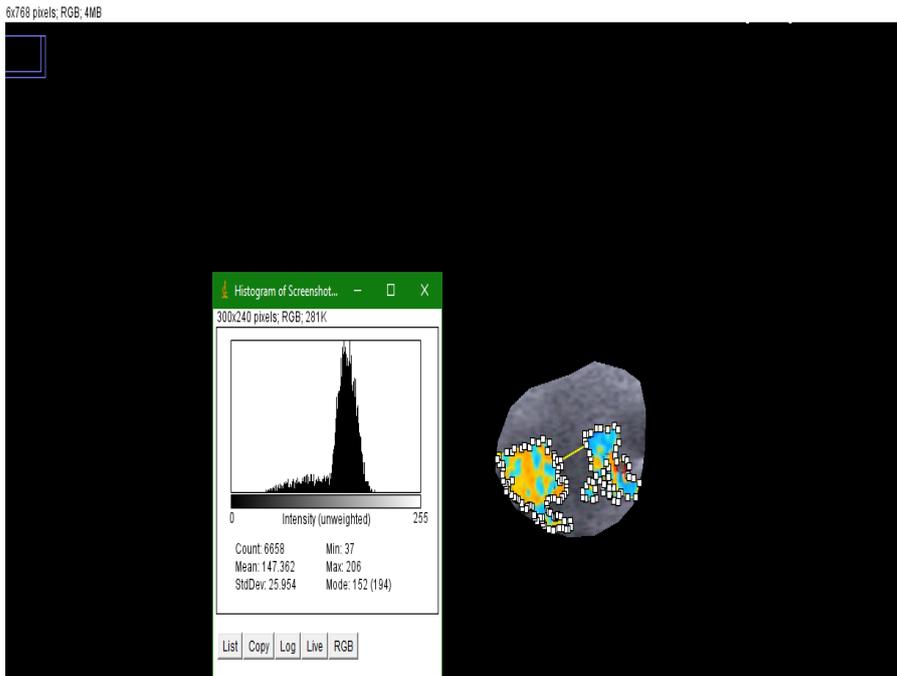
Figura 12: Processo di delineazione del corpo luteo con la funzione polygon di ImageJ per poi fare l'istogramma



L'immagine 2D (FIG.12) è stata convertita in un Immagine 3D (FIG.13) a colori originali con queste caratteristiche (Scala 1, altezza 0,35, Max 100, Min 0., Grid size 512, luminosità 0,2).

Figura 13: immagine 3D del corpo luteo vascolarizzato per osservare meglio la parte vascolarizzata, screenshot.

Per analizzare queste ecografie è stata usata una scala da 1-5 per dare la percentuale di vascolarizzazione del corpo luteo, questa è una valutazione soggettiva approssimata che tiene conto al grado 1 corrisponde un grado di vascolarizzazione basso (0%-20%), grado 2 Medio/basso (20%-40%), al grado 3 Medio (40%-60%), al grado 4 medio/alto (60%-80%), al grado 5 alto (80%-100%). (I modelli 2D e 3D sono serviti per osservare con più precisione le regioni vascolarizzate e da una valutazione soggettiva) Oltre a questa valutazione immediata, è stata fatta una valutazione oggettiva della vascolarizzazione mediante la conta dei pixel totali del corpo luteo e i pixel delle aree vascolarizzate.



I pixel totali sono stati contati tramite la funzione analisi>istogramma, lo stesso procedimento è stato effettuato per la conta dei pixel di vascolarizzazione delineando solo le aree vascolarizzate. (FIG.14) La vascolarizzazione è stata valutata con una scala da 1-5.

Figura 14: procedure di delineazione dei pixel vascolarizzati con imageJ, con istogramma

Tutti i dati analizzati sono stati riportati in un foglio Excel dove è stata calcolata la percentuale effettiva di vascolarizzazione dei corpi lutei dei soggetti (pecore), la percentuale effettiva è stata calcolata facendo la proporzione:

pixel totali / pixel vascolarizzati = 100 / X, in base al valore di X si determina il grado di vascolarizzazione.

Per osservare la relazione tra intensità di grigi e vascolarizzazioni sono state analizzate le immagini ecografiche catturate con il metodo B-mode, come prima delineando il corpo luteo e tramite la funzione di analisi>istogramma è stata calcolata la scala dei grigi e la media dell'intensità.

È stato calcolato il volume dei corpi lutei per capire le dimensioni effettive, partendo dal diametro con la seguente formula $[(4 * \pi * (d/143/2)^3)/3]$ (d=diametro in pixel; 143 è la lunghezza in pixel di un cm), presupponendo che il corpo luteo sia una sfera.

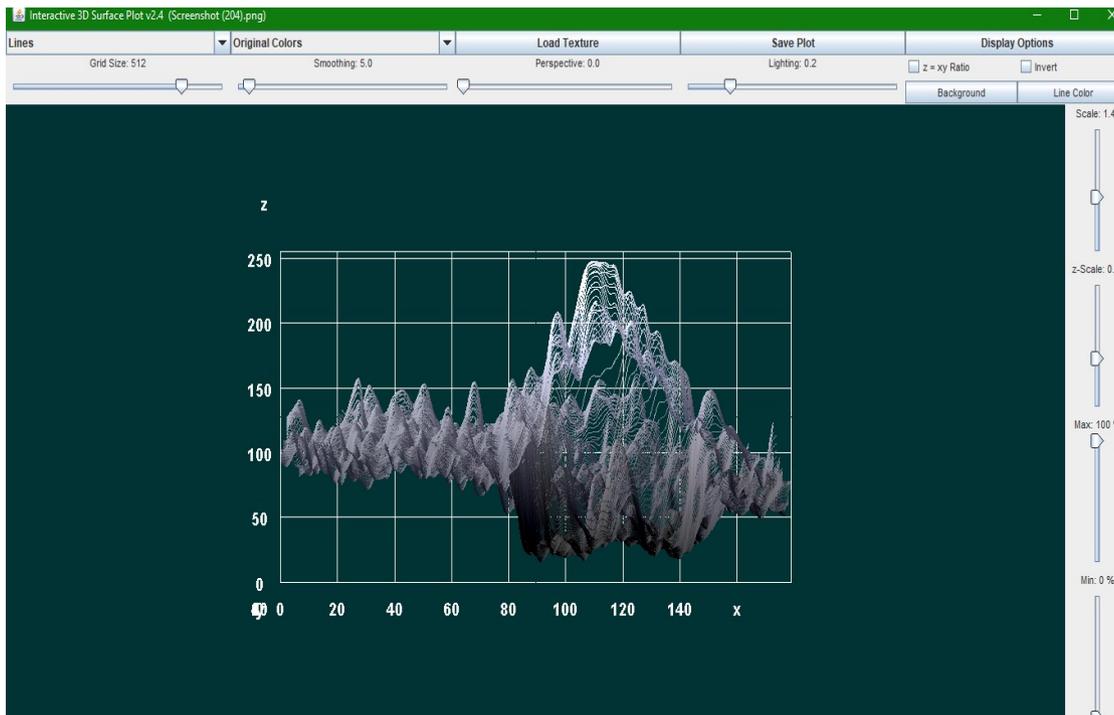


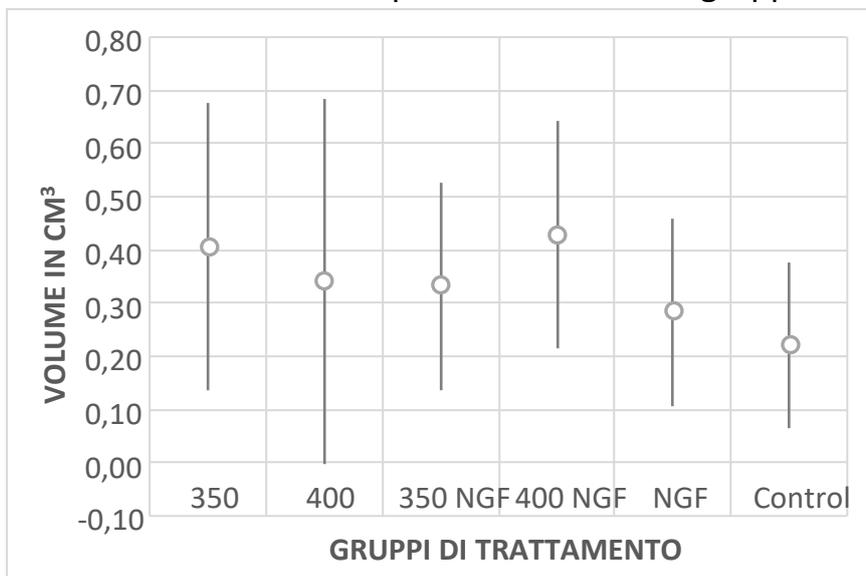
Figura 15: Rappresentazione 3D di un corpo luteo cavitario visto di profilo con il programma ImageJ

Si è osservata la cavitarietà dei corpi lutei cioè la presenza di liquido luteale caratterizzato dalla sua anaecogenicità per vedere se c'è una relazione tra cavitarietà ed intensità di grigio, per aiutarsi nell'osservazione del corpo luteo cavitario sono stati fatti tramite la funzione plugins>3D modelli 3D dei corpi lutei osservati di profilo per capire la profondità dell'immagine (FIG.15).

In fine sono stati riportati su una tabella di un foglio Excel la scale dei grigi e la percentuale di vascolarizzazione per osservare le differenze tra i gruppi trattati.

4. RISULTATI

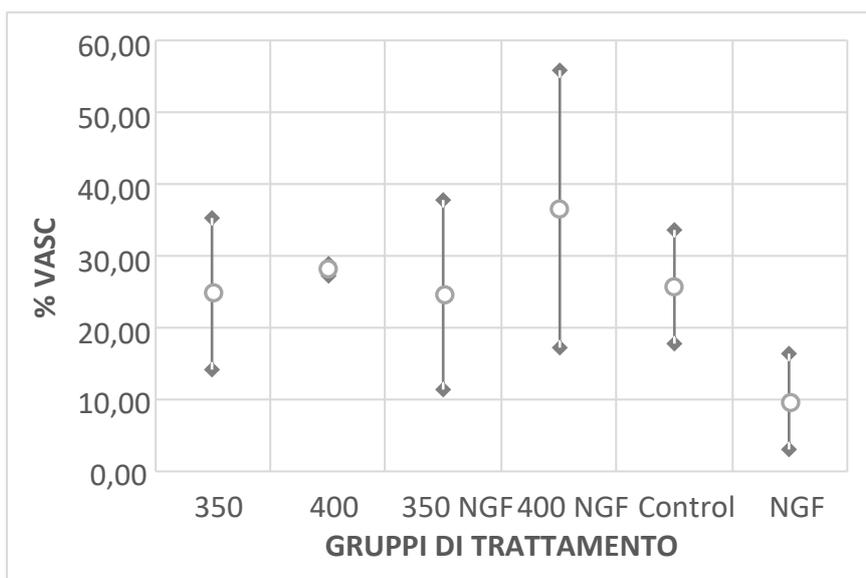
Grafico 1: Volume dei corpi lutei suddivisi nei gruppi di trattamento



In questo grafico sono riportati i dati ottenuti dall'analisi delle ecografie dei corpi lutei delle pecore trattati con diverse quantità di PMSG e NGF in relazione al volume medio dei corpi lutei. Nell'asse delle ascisse sono riportati le dosi di trattamento dei gruppi, nell'asse delle ordinate è riportato il volume dei corpi lutei in cm^3 .

Somministrando 350 U.I. di PMSG il volume medio è $0,40\text{cm}^3$; somministrando 400 U.I. di PMSG il volume medio è $0,34\text{cm}^3$; somministrando NGF e 350 U.I. di PMSG la media del volume è $0,33\text{cm}^3$; somministrando NGF e 400 U.I. di PMSG la media del volume è $0,43\text{cm}^3$; somministrando solo NGF la media del volume è $0,28\text{cm}^3$; il gruppo di controllo ha un volume medio di $0,22\text{cm}^3$.

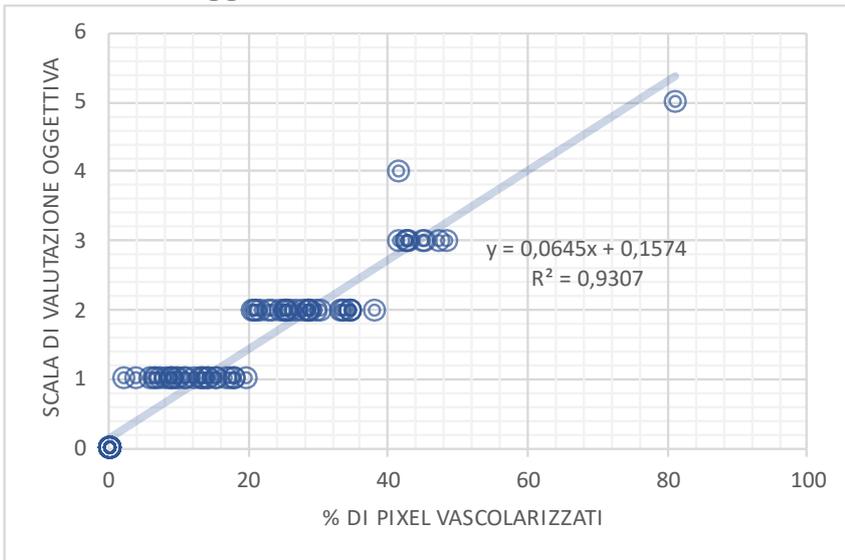
Grafico 2: Vascolarizzazione percentuale suddivisa nei gruppi di trattamento



Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei. Sono riportati i dati ottenuti dall'analisi delle ecografie dei corpi lutei delle pecore trattati con diverse quantità di PMSG

e NGF (ascissa) in relazione alla vascolarizzazione % media (ordinata dei corpi lutei. Somministrando 350 U.I. di PMSG la vasc.% è del 24,73%; somministrando 400 U.I. di PMSG la vasc.% è del 28,14%; somministrando NGF e 350 U.I. di PMSG la vasc.% è del 24,59%; somministrando NGF e 400 U.I. di PMSG la vasc.% è del 36,66%; somministrando solo NGF la vasc.% è del 25,67%; il gruppo di controllo ha una vasc.% del 9,70%.

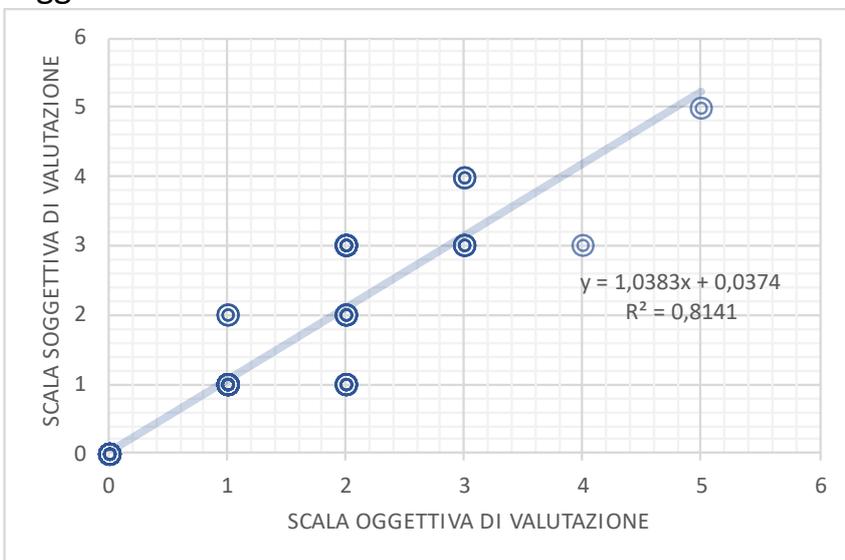
Grafico 3: Curva di regressione della percentuale dei pixel vascolarizzati e scala di valutazione oggettiva



Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei. Curva di regressione che mette in relazione la % dei pixel vascolarizzati (ascissa) e la valutazione oggettiva della vascolarizzazione (ordinate) dei corpi lutei.

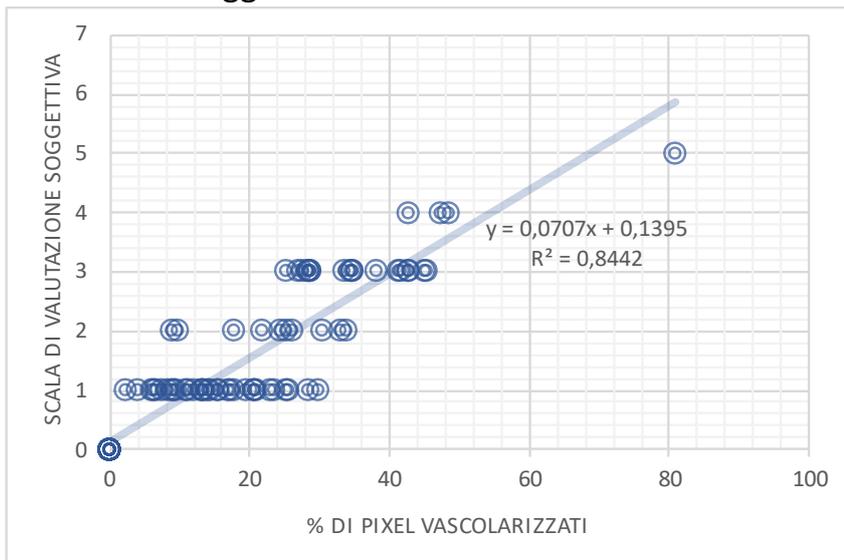
La tendenza è rappresentata dall'equazione $y=0,0645x+0,1574$, il coefficiente di determinazione R^2 (accuratezza) ha un valore alto, è un indice che misura il legame tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato, più si avvicina a 1 più i dati sono attendibili.

Grafico 4: Curva di regressione tra scala di valutazione oggettiva e scala di valutazione soggettiva



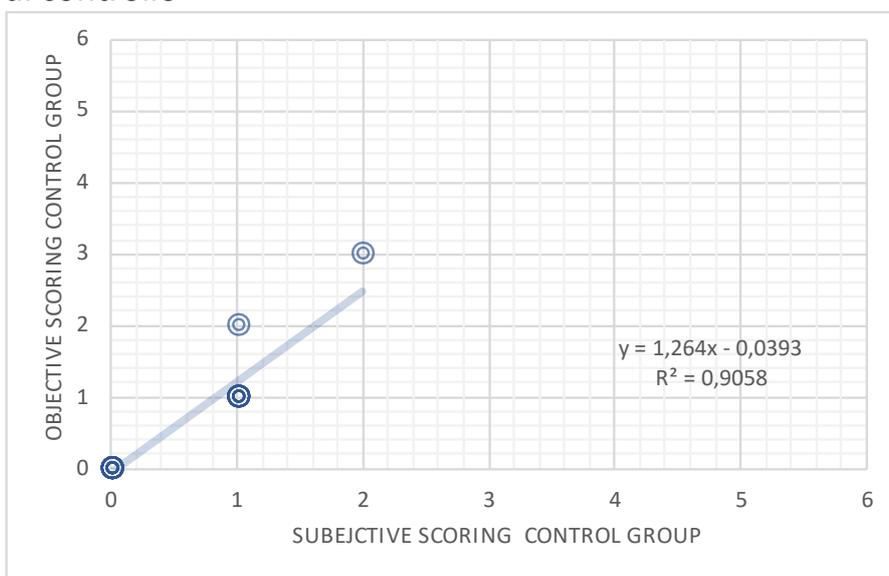
Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei. Relaziona la valutazione oggettiva della vascolarizzazione e la valutazione soggettiva dei corpi lutei totali, nell'asse delle ascisse sono riportati i gradi di valutazione oggettiva (1-5), 1 corrisponde al 20% di vascolarizzazione, 2 al 40%, 3 al 60%, 4 al 80% e 5 al 100%. Nell'asse delle ordinate sono riportati i gradi di valutazione soggettiva (1-5). È stata calcolata l'accuratezza ($R^2 = 0,8141$) e la funzione della linea di tendenza di equazione ($y = 1,0383x + 0,0374$).

Grafico 5: Curva di regressione della percentuale dei pixel vascolarizzati e scala di valutazione soggettiva



Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei. La curva di regressione relaziona vascolarizzazione percentuale dei pixel (asse delle ascisse) riportando le percentuali ad intervalli di 20%, nell'asse delle ordinate vengono riportati i gradi di valutazione soggettiva della vascolarizzazione dei corpi lutei. È stata calcolata la funzione della linea di tendenza ($y = 0,0707x + 0,1395$) e l'accuratezza ($R^2 = 0,8442$).

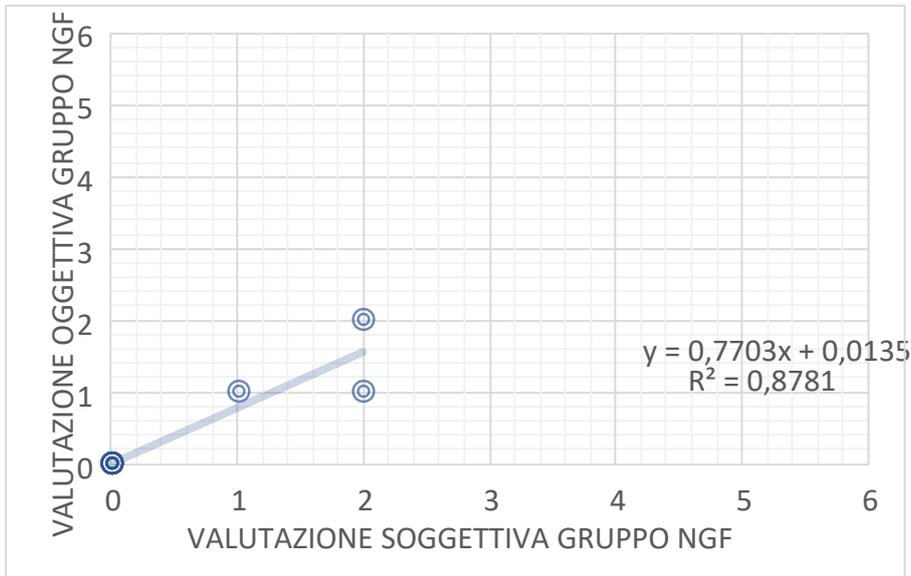
Grafico 6: Curva di regressione della valutazione Soggettiva ed Oggettiva del gruppo di controllo



Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei del gruppo di controllo, nell'asse delle ascisse sono riportati i gradi da 1-5 della valutazione soggettiva della

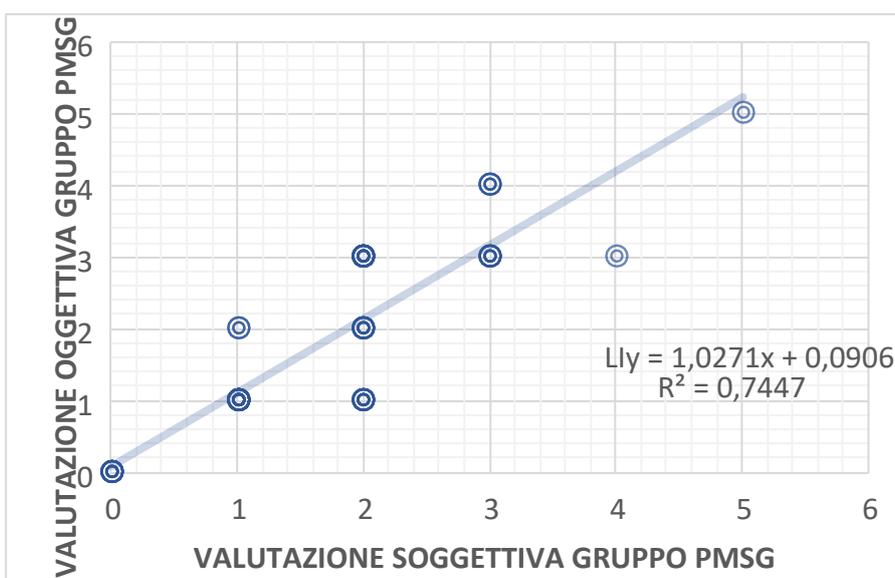
vascolarizzazione, nell'asse delle ordinate sono riportati gradi da 1-5 della valutazione oggettiva della vascolarizzazione, è stata calcolata la funzione della linea di tendenza ($y=1,264-0,0393$) e l'accuratezza ($R^2=0,9058$).

Grafico 7: Curva di regressione della valutazione oggettiva e soggettiva del gruppo trattato con NGF



Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei del gruppo trattato con NGF, nell'asse delle ascisse sono riportati i gradi da 1-5 della valutazione soggettiva della vascolarizzazione, nell'asse delle ordinate sono riportati gradi da 1-5 della valutazione oggettiva della vascolarizzazione, è stata calcolata funzione della linea di tendenza ($y=0,7703x+0,0135$) e l'accuratezza ($R^2=0,8781$).

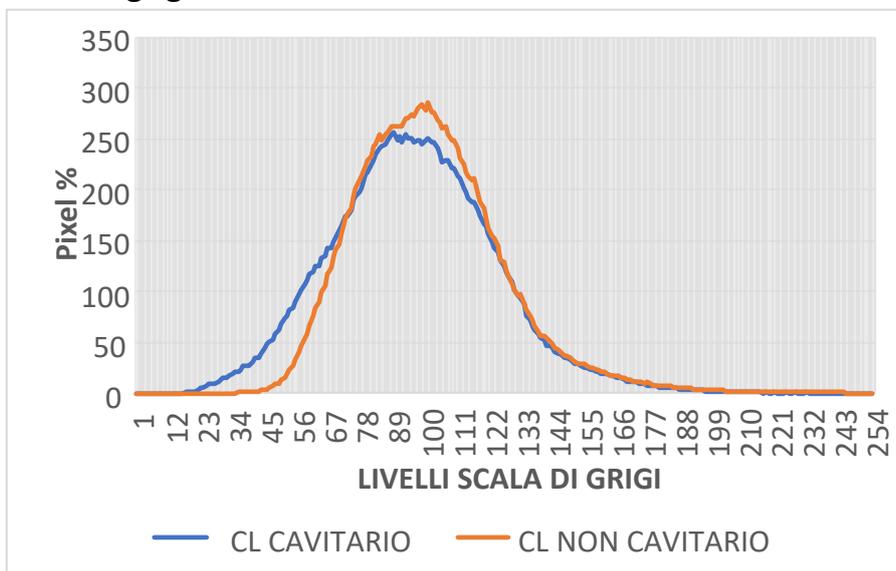
Grafico 8: Curva di regressione della valutazione soggettiva ed oggettiva del gruppo trattato con PMSG



Il grafico rappresenta i dati ottenuti dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei rispettivamente il gruppo trattato con PMSG. I dati dimostrano che il PMSG svolge un ruolo

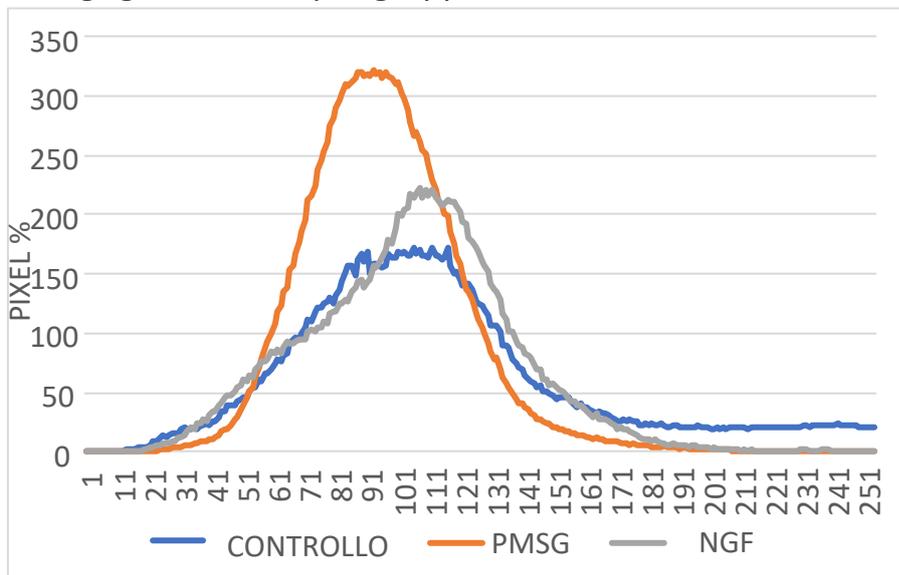
importante sull'aumento della vascolarizzazione. È stata calcolata la funzione della linea di tendenza ($1,0271x+0,0906$) e l'accuratezza ($R^2=0,7447$).

Grafico 9: Istogramma dell'Intensità dei grigi e percentuale dei pixel per ognuno dei livelli di grigio nei CL cavitari e non cavitari



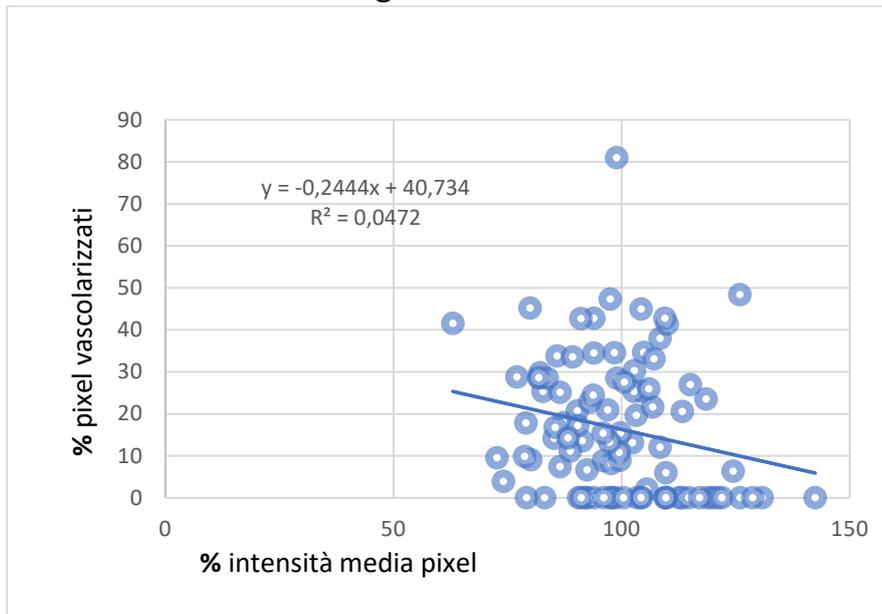
Istogramma che rappresenta con la linea blu i corpi lutei cavitari, con la linea arancione i corpi lutei non cavitari. Nell'asse delle ascisse sono riportati i livelli della scala d'intensità di grigio, nell'asse delle ordinate sono riportate le percentuali dei pixel per ognuno dei livelli di grigi.

Grafico 10: Istogramma dell'Intensità dei grigi e percentuale dei pixel per ognuno dei livelli di grigio suddivisi per gruppo di trattamento



Istogramma che rappresenta con la linea blu i CL del gruppo di controllo, con la linea arancione i CL del gruppo trattato con PMSG e con la linea grigia i CL del gruppo trattato con NGF. Nell'asse ascisse sono riportati i livelli della scala di grigi, nell'asse delle ordinate la percentuale dei pixel per ogni livello di grigio.

GRAFICO 11: Curva di regressione della vascolarizzazione ed intensità media dei pixel



Il grafico è stato ottenuto dall'analisi delle immagini ecografiche dei corpi lutei. La curva di regressione relaziona vascolarizzazione percentuale dei pixel nell'asse delle ordinate e l'intensità percentuale media dei pixel. Sono stati calcolati: la funzione della retta di regressione ($y = -0,2444x + 40,734$) ed il coefficiente di determinazione $R^2 = 0,0472$.

5. DISCUSSIONE

Lo studio condotto fino ad oggi si è basato sulla raccolta di immagini ecografiche analizzate con il programma ImageJ. Sono stati presi in analisi gruppi di pecore trattate con 350 o 400 U.I. di PMSG con (350NGF, 400NGF) o senza NGF (350, 400) e il gruppo di controllo per la valutazione della vascolarizzazione dei corpi lutei, ha portato alla raccolta dei dati visti fino ad ora. Da un'analisi di questi dati, ricavati da una valutazione delle immagini ecografiche, si evidenzia la relazione tra il volume dei corpi lutei e la vascolarizzazione degli stessi. Dapprima viene messa in relazione l'influenza che ha la somministrazione di PMSG con il volume e la vascolarizzazione; si ottiene che il volume medio dei corpi lutei e la vascolarizzazione sono maggiori nelle pecore trattate con 400 U.I. di PMSG e 400 U.I. di NGF (grafico1-2). Da questo risultato si può ipotizzare che il PMSG aumenti la vascolarizzazione dei corpi lutei.

La presenza di un sistema vascolare funzionale nel CL fornisce ossigeno, nutrienti, ormoni e altri fattori necessari alla crescita luteale (Acosta et al. 2003). Uno studio

di Figueira L. (et al 2015) dimostra che la valutazione della vascolarizzazione luteale mediante ecografia color-doppler può essere utilizzata come parametro per valutare la funzione luteale negli ovini. Risultati simili sono stati precedentemente osservati in bovini (Acosta et al. 2003). La diminuzione della vascolarizzazione luteale si è verificata più velocemente della diminuzione dell'area del tessuto luteale. Le cellule del sistema vascolare costituiscono circa il 50% di tutti i tipi cellulari nella ghiandola luteale (Oliveira, et al. 2018). Questo effetto è stato osservato anche da (Herzog et al. 2010) che ha concluso che il flusso sanguigno è un indicatore più appropriato per la funzione luteale rispetto alla dimensione del corpo luteo, in particolare nelle vacche.

Nei grafici (3-4-5) si è osservata la relazione tra valutazione soggettiva e valutazione oggettiva dei corpi lutei. La prima, evidenzia la vascolarizzazione dei corpi lutei dalle immagini ecografiche con la modalità ecocolor doppler dando un punteggio da 1-5; la seconda, calcolata con il programma di analisi ImageJ, conta i pixel della parte vascolarizzata e mette in evidenza la percentuale della vascolarizzazione dando un punteggio da 1-5. Le due valutazioni hanno una buona corrispondenza.

In uno studio di (Arashiro, et. al 2018) è stato possibile il rilevamento di animali non gravidi basandosi proprio sulla valutazione soggettiva della vascolarizzazione luteale mediante ecografia color Doppler.

Nei grafici (6-7-8) sono state analizzate le relazioni tra valutazione soggettiva ed oggettiva della vascolarizzazione per i singoli gruppi. Nel grafico 6 viene analizzato il gruppo di controllo, nel grafico 7 il gruppo trattato con NGF e nel grafico 8 il gruppo trattato con PMSG. I tre grafici hanno un'accuratezza alta che rafforza l'ipotesi di prima cioè, che è possibile valutare la vascolarizzazione del corpo luteo da un'immagine ecografica tramite l'uso di ecocolor doppler.

Dal grafico 9, in cui si è analizzato la relazione tra la percentuale dei pixel per ogni livello della scala di grigi tra corpi lutei cavitari e non, si osserva che i due picchi si differenziano. L'andamento lineare dei CL cavitari ha il picco di pixel al livello 89 della scala dei grigi, invece, l'andamento lineare dei corpi lutei non cavitari ha il picco di pixel a livello 101 della scala dei grigi. Questo aspetto supporta il fatto che un corpo luteo cavitario è ricco di liquido luteale e al momento dell'ecografia questo liquido rimanda echi ipocoegeni alla sonda.

È stata valutata l'influenza del PMSG nei soggetti trattati, analizzando l'intensità percentuale dei pixel corrispondenti ad un livello di scala di grigi (grafico 10). Questo, per vedere se c'è una relazione tra somministrazione di PMSG ed intensità di grigi ed una corrispondente vascolarizzazione. Nel grafico 10 l'andamento lineare dei pixel dei corpi lutei del gruppo trattato con PMSG ha un picco al livello 95 della scala dei grigi. Il gruppo di controllo ha un andamento lineare con il picco di pixel a livello 117 della scala dei grigi; infine il gruppo trattato con NGF ha un andamento lineare con il picco di pixel a livello 108 della scala dei grigi. Con i risultati ottenuti si può ipotizzare che, il trattamento con PMSG oltre ad influenzare la vascolarizzazione dei corpi lutei, può influenzare l'intensità dei grigi.

Nel grafico 11 si è osservata la relazione tra vascolarizzazione % ed intensità media dei pixel che evidenzia l'assenza di una relazione lineare con un R^2 non elevato.

6. CONCLUSIONE

Vari studi hanno dimostrato che la valutazione della vascolarizzazione del corpo luteo, mediante ecografia ecocolor-doppler, può essere utilizzata come parametro per valutare la funzione luteale negli ovini.

I dati raccolti dalle immagini ecografiche rielaborate con il programma di analisi ImageJ hanno evidenziato una ripetibilità alta sulla relazione tra valutazione soggettiva ed oggettiva della vascolarizzazione. L'utilizzo di questo software si è rivelato un metodo utile e di supporto per la valutazione dei dati.

Si è osservato che la cavitarietà del corpo luteo influenza l'intensità dei pixel.

Lo studio che è stato portato avanti è giunto a supportare la tesi che la somministrazione di PMSG nelle pecore porta ad un aumento della vascolarizzazione, del volume dei corpi lutei, della percentuale di intensità media dei pixel ma non è possibile trovare una relazione lineare tra intensità media dei pixel e vascolarizzazione.

7. BIBLIOGRAFIA:

- A. Menchaca, V. Miller, V. Salveraglio, E. Rubianes et al. (2007), Endocrine luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats, *Animal Reproduction Science*, Vol. 102, Edizione 1–2, ISSN0378-4320, p.p. 76-87, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.10.001>
- E.K.N. Arashiro, M. P. (2013, Ottobre). Tratto da <https://animal-reproduction.org/article/5b5a6045f7783717068b467d>
- Eduardo Kenji Nunes Arashiro, R. R. (2018, Gennaio 15), Vol. 106, p.p. 247-252, Tratto da ScienceDirect:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X17305113?via%3Dihub#!>

- Federici, 2020 P. V. (s.d.). Tratto da <https://ecografieroma.it/come-funziona-sonda-ecografica/>
- Fausto di Tora, et al (2006), Fisica degli Ultrasuoni.pdf
- Figueira, L., Fonseca, J., Arashiro, E., Souza-Fabjan, J., Ribeiro, A., Oba, E., Viana, J. e Brandão, F., et al. (2015), Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. *Reprod Dom Anim*, 50: p.p. 643-650.
<https://doi.org/10.1111/rda.12543>
- Graeme B Martin, Christopher M Oldham, Yves Cognié, Darryl T Pearce, et al. (1986), The physiological responses of anovulatory ewes to the introduction of rams , a review, *Livestock Production Science*, Vol.15, Edizione 3, ISSN 0301-6226, p.p. 219-247,
[https://doi.org/10.1016/0301-6226\(86\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0301-6226(86)90031-X).
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030162268690031X>
- G. Gajardo, C. Ulloa-Leal, X. Valderrama, L. Paiva, M.H. Ratto, et al. (2021) Heterologous beta-nerve growth factor (β -NGF) given at the LH surge enhances luteal function in dairy heifers, *Domestic Animal Endocrinology*, Vol. 77, ISSN 0739-7240,
<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2021.106645>
- Hayder Mohammed Hassan Habeeb, Michelle Anne Kutzler, et aal. (2021), Estrus Synchronization in the Sheep and Goat, *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, Vol. 37, Edizione 1, p.p. 125-137, ISSN 0749-0720, ISBN 9780323775465,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0749072020300797>)

- Hoppen, H.O. et al. (1994), The equine placenta and equine chorionic gonadotrophin, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes* Vol. 102, Edizione 3, p.p. 235-243
- Herzog K, Brockhan-Ludemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H, et. al 2010: Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 73, p.p. 691– 697
- J.E Romano, C.J Christians, B.G Crabo, et al. (2000), Continuous presence of rams hastens the onset of estrus in ewes synchronized during the breeding season, *Applied Animal Behaviour Science*, Vol. 66, Edizione 1–2, ISSN 0168-1591, p.p 65-70,
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00076-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00076-3)
- J.P.C. Greyling, C.H. Van Niekerk, et al. (1991), Different synchronization techniques in Boer goat does outside the normal breeding season, *Small Ruminant Research*, Vol. 5, Edizione 3, ISSN 0921-4488, p.p. 233-243,
[https://doi.org/10.1016/0921-4488\(91\)90128-D](https://doi.org/10.1016/0921-4488(91)90128-D)
- Laurlee Sherwood, H. K., et al. (2010), *Fisiologia degli animali, dai geni agli organismi*. In H. K. Laurlee Sherwood, *Fisiologia degli animali, dai geni agli organismi*. Zanichelli.
- Mattoon J.S., Nyland T.G., et al. (2016), *Trattato di ecografia del cane e del gatto*, Edra, Terza Edizione
- Medan M.S., Abd El-Aty A.M., et al. (2010), *Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction*, Vol. 1, Edizione 2, p.p. 123-128,
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S2090123210000342?token=11FFAD1FB6E5C15F9E3C7FDB022D52B7B4AFD57F108B5DADA869856D99154F56FE>

[7DC5B77F11D6464AC92A0AD8B0CAB0&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220819130328](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.036)

- Nolsøe CP, Lorentzen T, et al. (1991 Dec 9), Farve-Doppler-ultralyd. Princip, teknik og kliniske anvendelsesmåder [Color Doppler ultrasound. Principles, technique and clinical use possibilities]. Ugeskr Laeger, Danish, PMID: 1776196, p.p. 3549-53
- Oliveira, M., et al. (2018, febbraio 13). *Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler* .
- Orlacchio A., et al. 2010, *Ecografia*, <https://art.torvergata.it/bitstream/2108/34136/1/03%20Ecografia.pdf>
- P. Tribulo, O. Bogle, R.J. Mapletoft, G.P. Adams, et al. (2015), Bioactivity of ovulation inducing factor (or nerve growth factor) in bovine seminal plasma and its effects on ovarian function in cattle, *Theriogenology*, Vol. 83, Edizione 9, ISSN 0093-691X, p.p. 1394-1401, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.014>.
- Ruggero Bortolami, E. C. (2018). Anatomia e Fisiologia degli animali domestici. In E. C. Ruggero Bortolami, *Anatomia e Fisiologia degli animali domestici*. Edagricole.
- Riccitelli S., et al. (2014), Esecuzione dell'esame ecografico dell'addome sup. regolazione dell'ecografo, posizione della sonda, orientamento dell'immagine, <http://www.siemg.it/files/IV-Congresso-Nazionale/COME%20SI%20ESEGUIE%20L%27ESAME%20DELL%27ADDOME%20SUPERIORE.pdf>
- V.M. Tanco, M.D. Van Steelandt, M.H. Ratto, G.P. Adams, et al. (2012), Effect of purified llama ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle, *Theriogenology*, Vol.78, Edizione 5, ISSN0093-691X, p.p.1030-1039, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.03.036>.

