



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Dipartimento di Agronomia, Alimenti, Risorse naturali, Animali e Ambiente

Corso di laurea triennale in

Scienze e Tecnologie Animali

## **Studio dell'ecotessitura dei corpi lutei nelle bufale**

Relatore: Prof. Calogero Stelletta

Laureando: Paolo

Vigolo

Matricola n.1222291

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. SPECIE BUFALINA.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.1 Origine e diffusione .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.2 ALLEVAMENTO BUFALINO IN ITALIA.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. GESTIONE DELLA RIPRODUZIONE NELLE BUFALA .....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1.ANATOMIA E FISILOGIA RIPRODUTTIVA DELLA SPECIE BUFALINA ...</b>	<b>10</b>
<i>Stagionalità specie bufalina.....</i>	<i>10</i>
<i>Ciclo estrale ed estro.....</i>	<i>11</i>
<i>Pubertà.....</i>	<i>12</i>
<i>Anatomia e fisiologia ovaie.....</i>	<i>13</i>
<i>Sviluppo e mortalità embrionale.....</i>	<i>14</i>
<i>Gravidanza.....</i>	<i>15</i>
<b>1.3. TECNOLOGIE RIPRODUTTIVE NELLE BUFALE.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.1. AI- ARTIFICIAL INSEMINATION .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.2. SINCRONIZZAZIONE DEGLI ESTRI E DELL'OVULAZIONE .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.3. MOET-MULTIPLE OVULATION EMBRYO TRANSFER .....</b>	<b>23</b>
<b>1.3.4. PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI .....</b>	<b>24</b>
<b>1.4. USO DELL' ECOGRAFIA NELLE BUFALE .....</b>	<b>26</b>
<b>1.5. ANALISI IMMAGINI ECOGRAFICHE .....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.1 Ecografia delle ovaie.....</b>	<b>29</b>
<b>1.5.2. Cisti ovariche .....</b>	<b>30</b>
<b>1.5.3 Ecografia dell'utero e diagnosi di gravidanza.....</b>	<b>31</b>
<b>2. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>34</b>
<b>2.1. ANALISI E ELABORAZIONE DATI .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.1. DETERMINAZIONE CORPI LUTEI GRAVIDICI E NON.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1.2. DETERMINAZIONE DEGLI ASSI.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1.3.DETERMINAZIONE DEL VOLUME.....</b>	<b>38</b>
<b>2.1.3. DETERMINAZIONE DATI ECOTESSITURA .....</b>	<b>39</b>
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>40</b>
<b>4. DISCUSSIONE.....</b>	<b>53</b>
<b>5. CONCLUSIONI.....</b>	<b>57</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>58</b>

## **ABSTRACT**

This thesis debates the usage of the imageJ software for the characterization of corpora lutea's echotexture in the buffalo species.

In this study, we collected ultrasound images of buffalo cows' reproductive structures, in particular ovaries and uterus.

In these images, corpora lutea were identified and analyzed through the imageJ software.

ImageJ was used for the measurements of corpora lutea's longer and shorter axes, which were then used to calculate corpora lutea's volume. Subsequently, the corpora lutea's echotexture was analyzed through the measurements of corpora lutea's pixels count and mean pixel value.

The collected data were then separated between gravid corpora lutea and non gravid corpora lutea for comparative purposes.

In addition, ultrasound images of ovarian cysts were also analyzed for the same data as corpora lutea and then cysts' data were compared with the corpora lutea's data in order to highlight the differences in size and echotexture between the two.

# 1. INTRODUZIONE

La specie bufalina è allevata e diffusa in tutto il mondo sia a scopo produttivo (latte e carne) sia per una economia di sussistenza, dove la bufala è utilizzata principalmente come forza lavoro.

La specie bufalina differisce da quella bovina per via di diversi aspetti dal punto di vista anatomico e fisiologico. Le bufale, infatti, sono animali poliestrali stagionali, sono più tardive delle bovine nel raggiungimento della maturità sessuale e presentano una maggiore variabilità nella durata del ciclo estrale e dell'estro stesso con scarse manifestazioni estrali, che rendono difficile l'individuazione del calore per l'inseminazione artificiale.

Per far fronte ai diversi ostacoli posti dalla fisiologia delle bufale vengono utilizzate varie tecnologie riproduttive. Tra queste vi sono protocolli di sincronizzazione dell'estro e dell'ovulazione per aumentare i tassi di concepimento con l'inseminazione artificiale oppure per destagionalizzare la mandria come in Italia, allo scopo di allineare la produzione di latte con la domanda di mozzarella. Altre tecnologie riproduttive sono invece usate per la produzione di embrioni in vivo (MOET) o in vitro (OPU).

Infine, una delle tecnologie riproduttive che trova ampio impiego nella specie bufalina è l'ecografia, in quanto permette il monitoraggio della fisiologia riproduttiva degli animali, migliora l'efficienza nell'applicazione di protocolli di sincronizzazione ed è utilizzata anche nella raccolta degli embrioni (OPU).

In questo studio è stata effettuata l'analisi di immagini ecografiche di corpi lutei di bufale mediterranee italiane, allo scopo di andare a caratterizzare l'ecotessitura del corpo luteo nelle bufale. L'analisi è stata fatta attraverso il software imageJ e sono state rilevate le dimensioni dei corpi lutei (lunghezza degli assi e volume) e le caratteristiche ecotessutali (intensità e conta dei pixels). I corpi lutei sono stati



poi suddivisi tra gravidici e non gravidici per fare un confronto, e successivamente i dati dei corpi lutei sono stati comparati con dati ottenuti eseguendo le stesse analisi su cisti follicolari e luteali.

I risultati non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra i corpi lutei gravidici e non, mentre dal confronto con le cisti sono emerse differenze significative sia per le dimensioni sia per l'ecotessitura.

## **1.1. SPECIE BUFALINA**

### **1.1.1 Origine e diffusione**

Esistono due specie di bufalo, il bufalo africano (*Syncerus caffer*) e il bufalo d'acqua o "water buffalo" (*Bubalus bubalis*). Quest'ultimo è diffuso in tutti e cinque i continenti e se ne possono distinguere due tipologie il tipo di fiume e il tipo di palude.

Questa distinzione fu fatta per la prima volta da McGregor nel 1941, sulla base di criteri morfologici e comportamentali. Il bufalo di fiume e di palude discendono rispettivamente da due popolazioni diverse di bufalo d'acqua asiatico (*Bubalus arnee*) che si sono diffuse in aree geografiche separate, divergendo dal punto di vista evolutivo. Il tipo di fiume si è diffuso verso ovest: in Egitto, nei Balcani e in Italia (6300 anni fa), mentre il tipo di palude dopo essere stato addomesticato nelle regioni confinanti tra Cina e Indocina si è disperso attraverso il sud-est asiatico e la Cina (3000-7000 anni fa), e attualmente gli areali di distribuzione dei due tipi si sovrappongono nell'area dell'est India e del Bangladesh.

Tipo di fiume e di palude differiscono anche dal punto di vista morfologico. Il primo ha un mantello nero e generalmente le corna curve, mentre il tipo di palude ha un mantello grigio scuro con una o due strisce bianche sulla gola e delle corna chiare relativamente dritte e occasionalmente lunghe.

Inoltre, dal punto di vista genetico, i due tipi di bufalo d'acqua hanno corredo cromosomico differente, il tipo di fiume ha  $2n=50$  mentre per il tipo di palude  $2n=48$ . Questa disparità cromosomica fa sì che in caso di incroci gli ibridi F1

abbiano  $2n=49$  e ibridi F2 possono avere rispettivamente  $2n=48$  o  $49$  se per tre-quarti tipo di palude, mentre  $2n=49$  o  $50$  se per tre-quarti tipo di fiume, e in questi casi i soggetti risultano avere una ridotta fertilità per via di uno sbilanciamento dei gameti (BMAO Perera, 2008). Questo ha determinato un problema soprattutto in alcuni paesi dove si è cercato di incrementare la produzione di latte delle bufale incrociando femmine di palude con bufali di fiume.

Attualmente la popolazione globale di bufalo d'acqua conta 204 milioni di capi, di cui 81,5% bufalo di fiume e 18,5% bufalo di palude. Entrambe le popolazioni sono concentrate per il 98% in Asia (197 milioni di capi), seguita dall'Africa (3,4 milioni di capi, Egitto in particolare) e Sud America (2 milioni di capi). Del tipo di fiume quasi il 69% si trova in India, mentre per il tipo di palude il 63% è in Cina. (Y. Zhang et al. 2020).

Un'analisi dei numeri di popolazione di bufali tra il 2008-2017, usando dati di 43 paesi disponibili nel database della FAO, ha evidenziato un incremento significativo del numero di bufali di fiume di circa 1,8 milioni/anno, e una diminuzione media di circa 180000 capi/anno per i bufali di palude, con un lieve incremento tra 2014-2016.

Va comunque considerato che questo trend è diverso tra i paesi, ad esempio il numero di capi è aumentato in Cina e Myanmar, diminuito in Malesia mentre in Indonesia, nelle Filippine, in Thailandia e in Vietnam il numero di capi si è stabilizzato negli ultimi 3-5 anni dopo una iniziale diminuzione.

Solitamente il bufalo di palude è sfruttato come animale da tiro, perciò utilizzato per arare i terreni o per il trasporto, e secondariamente come fonte di cibo per la produzione di carne. Questa situazione ha fatto sì che con la meccanizzazione dell'agricoltura ci sia stato un calo nel numero di bufali di palude.

Al contrario il bufalo di fiume è allevato per la produzione di latte e di carne che si differenziano da quelli bovini, il latte per un maggiore titolo di grasso e proteine, rispettivamente 6-9% di grasso e 4-5% di proteine contro 3,3% e 3,5% del latte bovino, e la carne per un più basso contenuto di colesterolo. Solitamente il latte di bufala è utilizzato per il consumo diretto, in particolare nel subcontinente Indiano, dove il surplus è poi processato in burro, latte condensato, o formaggi particolari. Oppure visti gli alti titoli di grasso e proteina, il latte di bufala è

particolarmente adatto alla produzione casearia, per cui in Italia è utilizzato per la produzione di un formaggio tipico che è la mozzarella di bufala.

Esistono diverse razze di bufalo di fiume, e vengono distinte sulla base della loro localizzazione geografica e delle differenze fenotipiche. Tra queste vi sono la razza Murrah, Nili-Ravi, Kundi, Jafarabadi e Nagpuri che sono diffuse soprattutto nelle aree di India e Pakistan, e poi vi è il tipo mediterraneo che rappresenta circa il 3% della popolazione mondiale di bufali di fiume e include un gruppo di popolazioni simili dal punto di vista fenotipico diffuse in Italia, Bulgaria, Romania, Grecia, Turchia, Egitto, Iran, Iraq e Siria.

Nonostante queste popolazioni abbiano ascendenti comuni, in Bulgaria, Romania e in minor parte, Turchia, il bufalo mediterraneo è per lo più utilizzato per incroci con razze indo-pakistane di fiume (Murrah e Nili-Ravi) al fine di migliorare la produzione di latte. Al contrario invece, in paesi quali l'Italia e l'Egitto le popolazioni di bufalo mediterraneo hanno mantenuto l'originale corredo genetico.

### 1.1.2 ALLEVAMENTO BUFALINO IN ITALIA

Per quanto riguarda l'introduzione della specie bufala in Italia, prima dell'anno mille non esiste una documentazione attendibile, quello che alcuni sostengono è che sia stata introdotta dopo la caduta dell'Impero Romano con le invasioni longobarde che portarono nella penisola diverse popolazioni bovine che oggi vengono definite razze autoctone (es. razza Podolica, Maremmana, Reggiana e altre).

Le prime fonti certe della presenza della bufala si ritrovano a partire dall'anno mille, dove da alcuni testi si apprende che i bufali erano già presenti in Italia meridionale nel periodo normanno (1000-1194). Questo è probabilmente dato dal fatto che i normanni successero nel 1061 agli arabi, che si erano già insediati in Sicilia nell'827 dopo aver conquistato anche Siria e Egitto. Gli arabi trasferirono la specie bufalina dalla Siria fino all'Egitto per cui è verosimile pensare che furono loro ad introdurre le bufale in Italia. Per quanto riguarda invece la produzione di mozzarella di bufala, la prima testimonianza certa si ha nel 1500, dove

Bartolomeo Scappi, cuoco del vaticano, la inserisce in un ricettario di ricette per la mensa del papa.

Attualmente in Italia la razza bufalina allevata è la “Mediterranea Italiana”, che dal dopoguerra ad oggi ha registrato un continuo aumento. Inizialmente si trattava di un animale che poteva essere considerato a triplice attitudine: latte, carne e forza lavoro, ma successivamente è stata via via selezionata per la produzione di latte a discapito della valorizzazione della sua carne, e sostituita nel lavoro dall’impiego dei mezzi meccanici.

In Italia vi è l’Associazione Nazionale Allevatori della Specie Bufalina (A.N.A.S.B.), istituita nel 1979 e riconosciuta nel 1994 dal Mipaaf. Il Decreto Ministeriale 20154 dell’11 Febbraio 2000 affida ad ANASB il Libro Genealogico della Specie Bufalina. Sempre nello stesso anno, il D.M. 201992 del 5 Luglio 2000 riconosce che le bufale iscritte al Libro Genealogico appartengono ad una propria razza, definita come Bufala Mediterranea Italiana.

Al 31 dicembre 2022 la situazione fotografica della Banca Dati Nazionale dell’Anagrafe Zootecnica contava 431.850 capi vivi su 2.485 allevamenti.

Circa il 75% dei capi vivi e il 50% degli allevamenti sono siti in Campania, in particolare nelle province di Caserta e Salerno, che assieme al basso Lazio (province di Latina e Frosinone) e alle province di Foggia e Ismea definisce l’areale di produzione della Mozzarella di Bufala Campana DOP (Tab.0).

Tabella 0: Consistenze bufale mediterranee in Italia.

REGIONE	N. ALLEVAMENTI	N. CAPI VIVI
Campania	1.222	304.161
Lazio	710	87.918
Puglia	69	13.963
Lombardia	79	5.878
Veneto	119	2355

La Bufala mediterranea fa parte dei bufali di tipo di fiume e possiede 50 cromosomi ( $2n=50$ ). All’interno della mandria è presente uno scarso dimorfismo sessuale, e l’altezza degli animali al garrese varia da 1,35m a 1,50m.

In entrambi i sessi il mantello è color bruno chiaro tendente al marrone scuro, quasi nero, inoltre il pelo è scarso e la pelle resta quasi nuda. La pelle è di colore nero tendente al rosso o grigio ardesia, è molto spessa e possiede poche

ghiandole sudoripare, ma è ricca di ghiandole cutanee sebacee che la rendono untuosa. Le corna sono di colore bruno, simmetriche, lunghe 50-60cm nel maschio e superiori nella femmina, dirette lateralmente e all'indietro con una sezione alla base triangolare nei maschi e ovale nelle femmine, e con solchi e rilievi sulla faccia craniale. Il collo è ricco di pliche, convesso e privo di giogaia, mentre il petto presenta la tipica "punta di petto" (plica cutanea a forma di borsa). Il dorso è lungo e largo e la groppa è armonicamente sviluppata e di forma quadrata (Fig. 1.1, Fig 1.2).

Le femmine presentano un peso vivo adulto di 650kg, hanno una gravidanza che va dai 308 a 310 giorni e solitamente l'età media al primo parto si aggira sui 30 mesi. Dato che la bufala alle nostre latitudini è una specie poliestrale stagionale, la stagionalità dei calori si concentra nel periodo autunnale. Le bufale hanno una lunga carriera produttiva che arriva fino ai 15 anni con 10/11 lattazioni, per cui la richiesta di lattifere per la rimonta è bassa.

I vitelli alla nascita pesano 35-38kg se maschi e 30-35kg se femmine e presentano un folto mantello.

Per quanto riguarda la produzione di latte, le bufale producono in media 9 litri di latte al giorno con una percentuale di grasso e proteina rispettivamente di 7,7% e 4,67%, e con un 4,5-5% di lattosio, per un totale di circa 2.300kg di latte per lattazione.

Il maschio invece è tozzo ed ha un tronco largo e alto, presenta un peso di 700-800 kg e viene usato per la riproduzione dopo i due anni d'età.



## 1.2. GESTIONE DELLA RIPRODUZIONE NELLE BUFALA

### 1.2.1. ANATOMIA E FISIOLOGIA RIPRODUTTIVA DELLA SPECIE BUFALINA

#### *Stagionalità specie bufalina*

La specie bufalina è poliestrale stagionale, ovvero mostra delle fluttuazioni del tasso di fertilità durante l'anno.

In questo caso si tratta di animali a fotoperiodo negativo, cioè mostrano un naturale aumento della fertilità con il diminuire del numero di ore di luce giornaliero.

Nelle zone equatoriali, dove la durata del giorno rimane simile per tutto l'anno, la stagionalità riproduttiva è influenzata dalle condizioni ambientali, in particolare le alte temperature, l'umidità e la scarsa disponibilità e qualità del cibo fanno sì che le bufale entrino in un periodo di anestro fino alla stagione riproduttiva successiva (stagione delle piogge).

Al contrario, più ci si allontana dall'equatore, più le bufale risultano sensibili all'influenza del fotoperiodo. Il fattore principale che regola la fertilità di questi animali in base al fotoperiodo è la melatonina, la quale è un ormone prodotto dalla ghiandola pineale a livello cerebrale (Michael J. D'Occhio et al. 2020).

La secrezione di melatonina avviene durante la notte, per cui nei mesi di fotoperiodo negativo ho un aumento di melatonina che va a impattare sulla attività dei neuroni secernenti GnRH a livello ipotalamico, e di conseguenza, influenzando anche la produzione di gonadotropine dall'ipofisi e la funzionalità riproduttiva degli animali (Neglia G., 2020a).

La stagionalità riproduttiva nella bufala in Italia, fa sì che la stagione riproduttiva sia nei mesi da Agosto a Dicembre. La specie bufalina però, ha una gravidanza che dura 10 mesi, per cui in questa situazione il picco di latte per la produzione di mozzarella si avrebbe nel periodo autunno-invernale, dove la domanda di mozzarella di bufala è molto bassa, per cui al fine di sincronizzare la produzione di latte con la domanda di prodotto si ricorre all'utilizzo di tecnologie riproduttive per destagionalizzare a mandria.

### *Ciclo estrale ed estro*

Il ciclo estrale delle bufale ha una durata media di 21 giorni, ma in realtà rispetto alle bovine, la specie bufalina presenta un'elevata variabilità, infatti la durata del ciclo può andare dai 16 a 28 giorni. Il ciclo è suddiviso in proestro, estro, metaestro e diestro. Il proestro e l'estro costituiscono la fase follicolare, ovvero dove si ha lo sviluppo dei follicoli, il calore e l'ovulazione, mentre metaestro e diestro determinano la fase luteinica, caratterizzata dalla presenza del corpo luteo che produce progesterone.

Nelle bufale anche l'estro è variabile e va dalle 10-20h durante la stagione riproduttiva, mentre durante la stagione non riproduttiva l'estro può durare da 2 a 72h.(Campanile et al. 2010a).

Le manifestazioni estrali sono sia modificazioni fisiche che comportamentali che nelle bufale sono difficilmente individuabili:

- irrequietezza
- frequenti muggiti e minzioni
- gonfiore della vulva e cancellazione delle rughe sulla superficie esterna
- arrossamento vestibolare
- secrezione mucosa dalla cervice
- comportamenti omosessuali nei confronti delle cogeneri

Le manifestazioni fisiche come gonfiore della vulva e arrossamento richiedono un esame regolare dei singoli animali, inoltre lo scolo mucoso spesso nelle bufale è meno copioso rispetto alle bovine e anziché fuoriuscire, tende a depositarsi sul canale della vagina e viene escreto quando l'animale va in decubito, oppure con le urine (BMAO Perera 2011). Inoltre solo il 3,4% delle bufale mostra comportamenti omosessuali, mentre oltre il 60% presenta degli estri silenti. La ridotta intensità dell'estro nelle bufale può essere in parte collegata a più basse concentrazioni di estradiolo in circolo rispetto alle bovine (6,87-13,0 pg/ml rispetto a 10,0-14,0 pg/ml) (Neglia G. et al. 2020b).

Tra le soluzioni più comuni per l'individuazione dell'estro oltre all'osservazione dei sintomi, vi è la presenza del bufalo, che viene in particolare utilizzato per l'identificazione di estri silenti. (Suthar et al. 2010).

### *Pubertà*

Il tipo di fiume è più precoce del tipo di palude ed entrambi raggiungono la pubertà rispettivamente a 15-18 mesi e 21-24 mesi (Borghese 2005). Generalmente il peso vivo raggiunta la pubertà è 55-60% del peso vivo adulto che risulta essere 200-300kg per il tipo di palude e 250-400kg per il tipo di fiume .



L'età a cui viene raggiunta la maturità sessuale resta comunque molto variabile dai 18-46 mesi ed è influenzata da molteplici fattori (M.R. Jainudeen e E.S.E. Hafez, BMAO Perera 2011).

- genotipo
- nutrizione
- management
- clima e ambiente
- eventuali patologie

### *Anatomia e fisiologia ovaie*

Dal punto di vista anatomico gli organi genitali femminile della bufala sono più muscolosi e rigidi rispetto a quelli bovini, con delle corna uterine più convolute.

Il corpo dell'utero delle bufale misura solo 1-2cm, mentre quello bovino è 2-4cm. Inoltre la cervice della specie bufalina è più piccola e misura 3-10cm di lunghezza e 1,5-6cm di diametro, e presenta un canale più tortuoso con 3 pieghe cervicali (M. Drost, 2007).

Le ovaie nella specie bufalina hanno una forma più allungata e sono più piccole di quelle bovine. Le dimensioni medie di un ovaio nelle bufale varia tra 22-26x11-18x11-14 mm<sup>3</sup>, con un peso tra 2,9-6,1g.

Il corpo luteo invece può raggiungere un diametro e un peso rispettivamente di 10-15mm e 2,3g ed è spesso incorporato nello stroma ovarico per cui non protrude a differenza del follicolo dominante, e di conseguenza questa situazione rende difficile l'identificazione delle strutture ovariche tramite palpazione transrettale nelle bufale (J. Singh et al. 2000, BMAO Perera 1999).

Le ovaie delle bufale una volta raggiunta la pubertà presentano una riserva di 10.000-20.000 follicoli primordiali, rispetto agli oltre 100.000 di una bovina.

La crescita e lo sviluppo dei follicoli invece sono simili a quelli bovini, in quanto i follicoli sono reclutati in ondate, dove per ciascuna di esse si sviluppa un follicolo dominante che poi andrà ad ovulare oppure regredire.

Nelle bufale generalmente il 63% degli animali presenta 2 ondate per ciclo, il 33% risulta sviluppare 3 ondate, mentre il 3% ha solo una ondata follicolare. La prima ondata inizia in tutti gli animali al giorno 1, a seguito dell'ovulazione (giorno0),

mentre la seconda ondata follicolare si sviluppa attorno al giorno 11 negli animali che presentano due ondate, e all'incirca al giorno 9 negli animali che invece presentano 3 ondate. Infine la terza ondata follicolare si ha solitamente verso il diciassettesimo giorno. (Baruselli et al. 1997).

La dimensione del follicolo dominante nella specie bufalina è di circa 13-14mm di diametro e con un volume di 11-12ml (minore rispetto alle bovine dove il follicolo dominante arriva a 15-16mm di diametro e 16-17ml di volume).

L'intervallo dalla manifestazione dell'estro al picco di LH varia da 1-12h, con l'ovulazione che si verifica dalle 26-33h dopo il picco di LH (Neglia G. 2020a).

A seguito dell'ovulazione si ha la formazione del corpo luteo, il quale è una struttura endocrina con la funzione di produrre il progesterone, ormone fondamentale per la gravidanza nei mammiferi. Il corpo luteo nelle bufale ha un peso medio che va da 0,9g nella fase iniziale di sviluppo fino a 1,5g quando il corpo luteo è maturo (Gosh e Mondal 2006). In ciclo estrale regolare, il corpo luteo produce progesterone per circa 15 giorni, e le concentrazioni di progesterone variano da 5 a 12ng/ml tra il giorno 6 e il giorno 16 del ciclo estrale (Campanile G. et al. 2010).

### *Sviluppo e mortalità embrionale*

Lo sviluppo embrionale nelle bufale è più rapido rispetto alla specie bovina, nelle bovine gli embrioni sono localizzati nell'utero attorno al sesto giorno dopo l'estro, mentre nella specie bufalina si possono già osservare morule compatte a partire dal quinto giorno dopo l'estro e blastocisti dal giorno 6 (Neglia G. et al. 2003).

Per quanto riguarda la mortalità embrionale, questa rappresenta una delle maggiori cause di perdita di fertilità nella specie bufalina, in particolare in paesi come l'Italia dove le bufale sono fecondate fuori dalla stagione riproduttiva per soddisfare la richiesta di mercato.

Nella specie bufalina si può individuare mortalità embrionale precoce tra il giorno 15-24, una mortalità embrionale tardiva tra il giorno 25-45, e la mortalità fetale tra i giorni 46-90 (G. Campanile et al. 2010a).

Uno studio fatto su bufale mediterranea sottoposte ad ovsynch-TAI durante il periodo di declino

delle funzioni riproduttive ha evidenziato una mortalità embrionale del 45% tra il giorno 26 e giorno 40 di gravidanza, di cui l'8% per agenti infettivi (G. Campanile et al. 2005).

In generale si è osservato che la mortalità embrionale nella specie bufalina si ha tra il giorno 25 e il giorno 40 dall'epoca dell'inseminazione artificiale, e le perdite embrionali a seguito dell'inseminazione artificiale sono tra il 20-40% durante le stagioni a fotoperiodo positivo (G. Campanile, G. Neglia, 2010b).

### *Gravidanza*

La gravidanza nella specie bufalina ha una durata di circa 310 giorni per il tipo di fiume, mentre per il tipo di palude la durata media della gravidanza è di 320 giorni (BMAO Perera, De Silva 1985).

A seguito del parto l'involuzione dell'utero si completa circa 25-35 giorno dal post-parto (M.R. Jainudeen e E.S.E. Hafez, 1993), inoltre lo stimolo della suzione permette di accorciare il tempo di involuzione (Usmani et al. 1990).

Nelle bufale vi è anche un periodo di anestro post-parto che risulta essere più lungo rispetto alla specie bovina, solitamente ha una durata di 30-90 gironi, ma fattori come fotoperiodo, scarsa nutrizione e BCS, gestione della mungitura e il clima possono considerevolmente prolungare il periodo di anestro (BMAO Perera 2008).

## **1.3. TECNOLOGIE RIPRODUTTIVE NELLE BUFALHE**

### **1.3.1. AI- ARTIFICIAL INSEMINATION**

L'inseminazione artificiale è una importante tecnologia riproduttiva che negli anni ha permesso un grande miglioramento del management della riproduzione animale in quanto presenta diversi vantaggi:

- permette la diffusione di materiale genetico di valore levato

- non richiede la presenza del maschio in azienda (riduzione dei costi)
- permette di testare i maschi attraverso i test di progenie migliorando l'efficienza nella selezione
- può essere utilizzata per introdurre nuovo materiale genetico nella mandria
- si ha un maggior controllo sulla diffusione delle malattie veneree

Nella specie bufalina nonostante la possibilità di poter usufruire dell'inseminazione artificiale, l'accoppiamento naturale è ancora il principale responsabile delle gravidanze all'interno delle mandrie di bufale. Borghese (2010) ha riportato che l'inseminazione artificiale sulle bufale è utilizzata per il 5% in Italia, per un 3,7% in Azerbaijan, 0,3% in Egitto, e 0,1% in Romania. Solo in Bulgaria nelle aziende agricole cooperative statali l'inseminazione artificiale è utilizzata sull' 80% delle bufale. (Inderjeet e Balhara. 2016).

L'utilizzo dell'AI nelle bufale è ancora marginale per diversi motivi (Alim et al. 2014):

- la difficoltà nell'individuazione dei calori e del momento ideale per intervenire con l'inseminazione artificiale, dovuta soprattutto alla elevata presenza di calori silenti all'interno della mandria.
- la stagionalità, in quanto il fotoperiodo nelle zone temperate influenza anche le funzioni riproduttive del maschio determinando una migliore qualità del seme nei periodi autunno-invernali (stagione riproduttiva) rispetto al periodo primaverile-estivo (G. Sansone et al. 2000)
- scarsità di bufali ad elevato valore genetico sottoposti a test di progenie
- bassi tassi di gravidanza con l'IA (30-55% ) rispetto all'accoppiamento naturale (più del 60%) (G.N. Purohit et al. 2003)
- scarso management

Nella specie bufalina il maschio comincia la spermatogenesi attorno ai 12-15 mesi, ma l'eiaculato contiene spermatozoi vitali solo dopo 24-30 mesi d'età mo-

strandando quindi una certa tardività nel raggiungimento della maturità sessuale rispetto alla specie bovina (BMAO Perera 2008). Il volume di eiaculato nel bufalo è variabile a seconda della specie, dell'età, della stagione e dallo stimolo a cui è sottoposto l'animale, generalmente un bufalo giovane produce da 1-3ml di eiaculato, mentre bufali adulti da 1 a 6ml (quantità più bassa durante i mesi estivi) (G. Sansone 2000, Mahak et al. 2018). Mentre per quanto riguarda la concentrazione spermatica Galli et al. (1993) hanno osservato una concentrazione da 700Mln a 1,2Mld di spermatozoi/ml nei bufali di fiume allevati in talia.

Un aspetto da considerare è che il seme del bufalo non si presta molto bene alla crioconservazione, questo perchè ha un basso rapporto colesterolo/fosfolipidi che determina una maggiore sensibilità al processo di congelamento-scongelo. Tale processo infatti esercita sia uno stress chimico che fisico sul seme, che risulta poi avere ridotta motilità, vitalità e capacità di fertilizzazione rispetto al seme fresco, per cui è necessario l'uso di crioprotettori nella diluizione del seme. (S. Akhter et al. 2017). Per la diluizione del seme l'extender più utilizzato è a base di tris (idrossimetil-aminometano), tuorlo d'uovo e glicerolo, dove glicerolo e tuorlo d'uovo fungono da crioprotettori. Le concentrazioni di glicerolo utilizzate sono solitamente 6-7%, mentre la concentrazione del tuorlo solitamente adottata è il 20% (G.N. Purohit et al. 2003). In aggiunta, uno studio ha dimostrato come anche l'aggiunta di proteine oviduttali all'extender va a migliorare la qualità del seme a seguito dello scongelamento. Gli effetti di tali proteine sulla funzionalità del seme variano in base alla regione dell'ovidotto (ampolla o istmo) e alla fase del ciclo estrale in cui sono state prelevate (A. Kumaresan et al. 2005).

Uno studio presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II ha delineato la procedura di utilizzo del seme di bufalo per l'inseminazione artificiale come segue (G. Sansone et al. 2000):

- raccolta del seme attraverso la vagina artificiale a 39-41°C
- trasferimento del seme al laboratorio entro 6h dalla raccolta a 8-19°C
- valutazione del seme (volume, concentrazione, motilità, motilità progressiva, vitalità, integrità della membrana e dell'acrosoma degli spermatozoi)
- diluizione del seme fino 120-150 Mln di spermatozoi/ml

- raffreddamento del seme a 5°C ad una velocità di 0,2-0,4 °C /min
- impacchettamento del seme nelle paillettes (0,25ml)
- Equilibratura, 2h per la diluizione ad una fase, oppure 4-6h per la diluizione in due fasi, con la seconda diluizione 1h prima del congelamento
- congelamento delle paillettes in azoto liquido
- scongelamento in acqua calda a 37-45°C per 15-60s
- utilizzo del seme per l'inseminazione

Nella specie bufalina è possibile anche l'utilizzo del seme sessato. G. Campanile et al. 2011 hanno eseguito uno studio su bufale mediterranee comparando i tassi di gravidanza ottenuti utilizzando seme sessato e non (paillettes da 0,25ml con 2Mln di spermatozoi/ ml come dose inseminante). I risultati non hanno mostrato differenze nel tasso di gravidanza tra l'uso di seme non sessato(37.7%) e seme sessato (38.8%). Mentre per quanto riguarda il sito di deposizione, si è notato che il seme sessato depositato all'interno del corpo dell'utero ha prodotto un tasso di gravidanza più elevato rispetto a quello depositato a livello del corno uterino( 45,5% contro 32,3%).

In merito alla dose inseminante, un ulteriore studio sulle bufale mediterranee ha evidenziato che la dose ottimale nell'utilizzo di seme sessato risulta essere di 4Mln di spermatozoi per paillettes (0,25ml), ottenendo un tasso di gravidanza del 49,8% rispetto a 31,2% ottenuto con 2Mln di spermatozoi per dose(A. Gavi-  
raghi et al. 2013).

### 1.3.2. SINCRONIZZAZIONE DEGLI ESTRI E DELL'OVULAZIONE

Come detto precedentemente nella specie bufalina nonostante sia possibile l'utilizzo dell'inseminazione artificiale permane il problema dell'individuazione del calore, per via dell'elevata incidenza di estri silenti e scarsa espressione delle manifestazioni estrali e della stagionalità riproduttiva.

Per far fronte a questo problema sono state svolte numerose ricerche per riuscire a migliorare l'utilizzo dell'inseminazione artificiale e i tassi di gravidanza. L'approccio più pratico che si utilizza riguarda l'uso di protocolli per la manipolazione

dell'estro e dell'ovulazione. Queste strategie si basano sull'utilizzo di ormoni che agiscono a livelli differenti lungo l'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie e possono essere classificati in 2 categorie (Neglia G. 2020b):

- trattamenti per il controllo della fase luteale
- trattamenti che controllano lo sviluppo follicolare l'ovulazione

La manipolazione della fase luteale attraverso il trattamento ormonale si basa sull'utilizzo di prostaglandine (PG) e progesterone.

L'ormone principale coinvolto nei protocolli per la sincronizzazione degli estri è la prostaglandina PGF<sub>2</sub> $\alpha$  (o i suoi agonisti), la cui somministrazione va a causare la lisi del corpo luteo dal quinto

giorno del ciclo estrale a 5 giorni prima dell'estro successivo, determinando un rapido declino della concentrazione di progesterone entro 24h e portando allo sviluppo dell'ondata follicolare successiva che determina in seguito il calore e l'ovulazione (Kanokwan et al. 2022). Il trattamento con prostaglandine può prevedere la somministrazione di una singola dose di PG oppure una doppia somministrazione a distanza di 11-14d (Fig. 2).

L'efficienza nell'uso di prostaglandine per la sincronizzazione dell'estro dipende da diversi fattori quali : la concentrazione plasmatica di progesterone e le dimensioni del corpo luteo, in quanto corpi lutei neo-formati ad esempio hanno basso numero di cellule sensibili all'effetto delle prostaglandine per cui vanno incontro ad una luteolisi parziale e non si ha il ritorno in calore con l'ovulazione. Inoltre un altro fattore è lo stadio di sviluppo dei follicoli al momento del trattamento che influenza il tempo che intercorre dal momento del trattamento all'estro e all'ovulazione (L.F.C. Brito et al. 2002). Solitamente animali trattati quando non vi è un follicolo dominante mostrano manifestazioni estrali 4-6d dalla somministrazione di PG, mentre se vi è un follicolo dominante si ha l'estro dopo 2-3d dal trattamento. Quindi, per migliorare l'efficienza dei protocolli di sincronizzazione dell'estro spesso si utilizza l'ecografia per il monitoraggio dei follicoli e somministrazione di GnRH per assicurare l'ovulazione. I tassi di gravidanza a seguito dei protocolli per la sincronizzazione degli estri sono del 45-50% durante la stagione riproduttiva, ma calano fortemente al di sotto del 25% durante la stagione non

riproduttiva (F. De Rensis e F. Lòpez-Gatius 2007, Edwin Curading Atabay et al 2020).

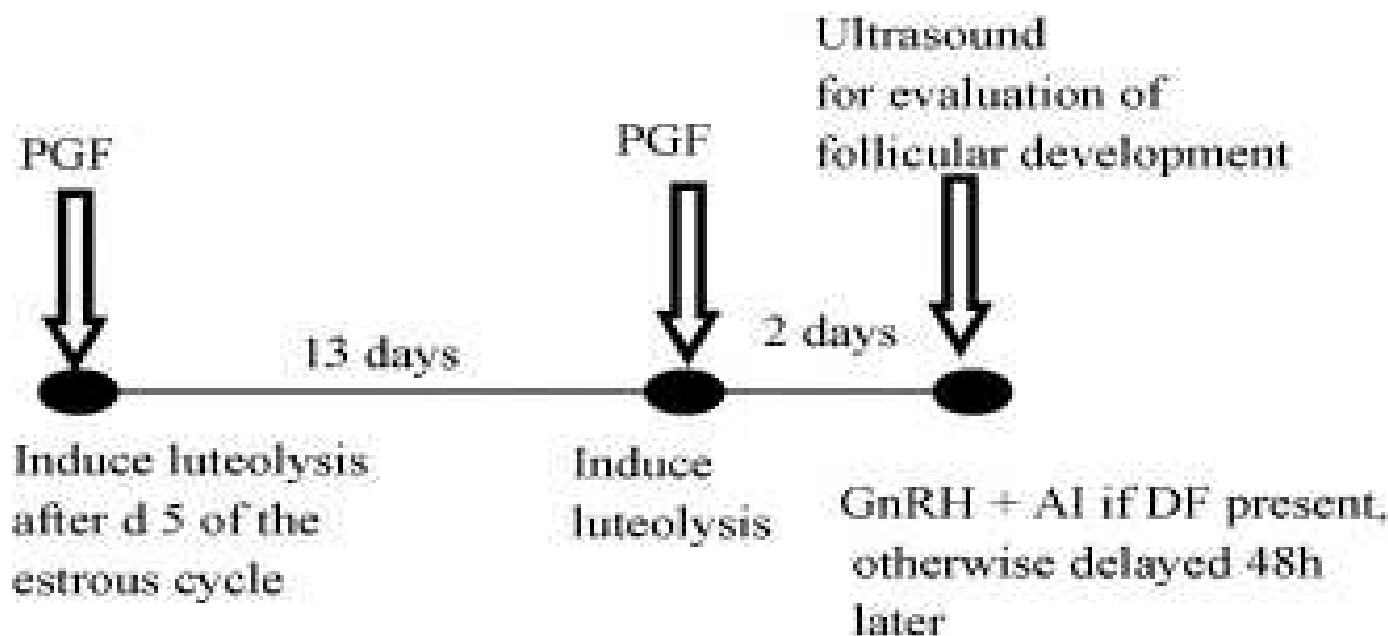


Figura 2: Schema del protocollo di sincronizzazione degli estri

Il limite principale nell'applicazione dei protocolli per la sincronizzazione dell'estro sta nel fatto che esiste comunque una certa variabilità tra il momento in cui si esegue il trattamento e il verificarsi dell'estro e dell'ovulazione, pertanto anche in questi casi risulta necessario il monitoraggio degli animali per stabilire il momento ideale per l'applicazione dell'inseminazione artificiale.

Un'alternativa ai protocolli di sincronizzazione dell'estro è la sincronizzazione dell'ovulazione (ov-synch). In questo caso si effettua una manipolazione dell'attività ovarica attraverso il controllo della fase luteale e dello sviluppo follicolare mediante l'utilizzo combinato di ormoni in modo da poter prevedere il momento dell'ovulazione e eseguire una inseminazione artificiale a tempo fisso (FTAI= "fixed time artificial insemination").

Il protocollo di sincronizzazione dell'ovulazione più utilizzato è detto "ov-synch" e si basa su una prima somministrazione di GnRH (giorno 0), seguita da una somministrazione di prostaglandine dopo 7 giorni (giorno 7) e una ulteriore dose di



GnRH somministrata 2 giorni dopo le prostaglandine (giorno 9) (Fig. 3) (GN Purohit et al. 2019). La somministrazione di GnRH porta alla produzione di un picco nella secrezione di LH, il quale causa l'ovulazione di un follicolo dominante e l'inizio della crescita di una nuova ondata follicolare. La successiva somministrazione di prostaglandine va invece a causare la regressione del corpo luteo formatosi a seguito dell'ovulazione, e infine la seconda dose di GnRH va a causare l'ovulazione di un neoformato follicolo dominante, e l'inseminazione viene eseguita dopo 16-22h (F. De Rensis e F. Lòpez-Gatius 2007). Un aspetto molto importante per il successo nell'applicazione dell'ov-synch riguarda la presenza di un follicolo dominante che va ad ovulare a seguito della prima somministrazione di GnRH, la quale può essere monitorata mediante ecografia. Uno studio ha mostrato che le bufale che ovulano a seguito della prima somministrazione di GnRH presentano un più alto tasso di gravidanza sia a 27 giorni (75%vs 30%) che a 45 giorni (66% vs 22%) e minore incidenza di mortalità embrionale tardiva rispetto alle bufale che non hanno ovulato con la prima dose di GnRH (Neglia G. et al. 2016).

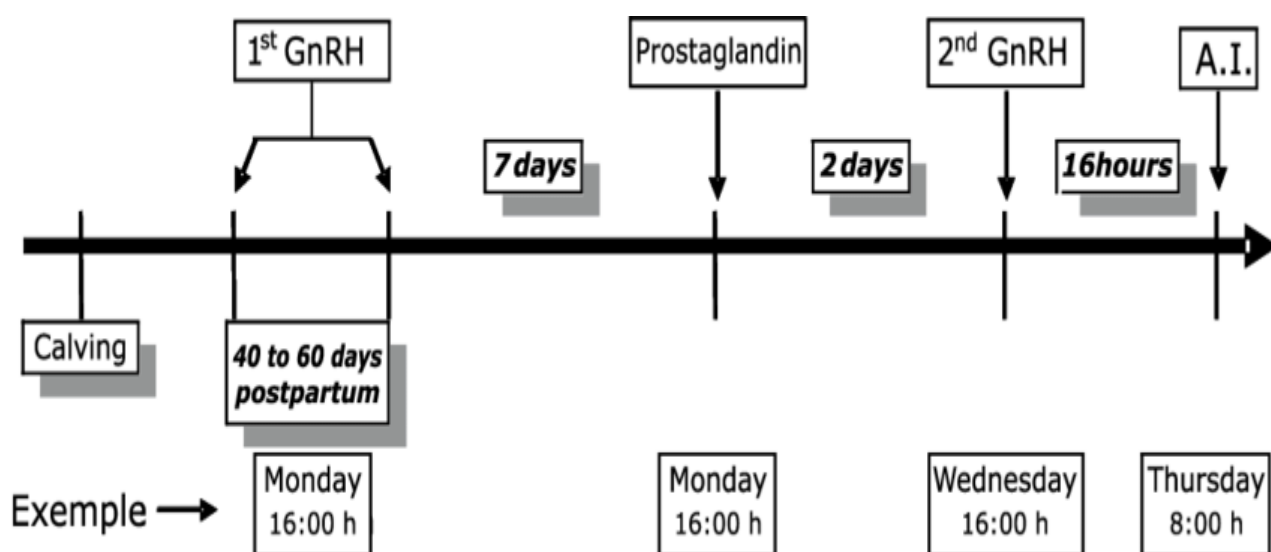


Figura 3: Schema del protocollo di ov-synch

I tassi di gravidanza ottenibili attraverso l'applicazione del protocollo ovsynch sono di circa 40-60% durante il periodo della stagione riproduttiva, ma anche in

questo caso, durante la stagione non riproduttiva i tassi di gravidanza calano fortemente per via dell'anestro stagionale ed una maggiore mortalità embrionale (Baruselli 2010, F. De Rensis et al 2005, G: Campanile et al. 2005).

Per far fronte alla stagionalità riproduttiva diversi studi hanno evidenziato come l'utilizzo di dispositivi intra-vaginali rilascianti progesterone (PRID) e la somministrazione di eCG possono permettere una ripresa della ciclicità negli animali in anestro e migliorare il tasso di ovulazione, la crescita del corpo luteo, la concentrazione iniziale di progesterone e i tassi di gravidanza nelle bufale soggette a FTAI durante la stagione non riproduttiva. In questo caso il protocollo prevede 9-10d con il dispositivo intravaginale, al momento della rimozione si somministra prostaglandina (per eliminare un eventuale corpo luteo) ed eCG, e in seguito, si esegue una somministrazione di GnRH 48h dalla rimozione e dopo 16h si può eseguire FTAI (N.A.T. Carvalho et al. 2013, Neglia G. 2003b).

Un'altra opzione nell'applicazione dell'ovsynch riguarda l'applicazione del re-synch che consiste in una somministrazione di GnRH al giorno 20-21 dall'inizio del protocollo di ovsynch. Questa strategia fa sì che al giorno 27, con la diagnosi di gravidanza, se l'animale non è gravido si può procedere all'amministrazione di prostaglandina e successivamente, due giorni dopo GnRH seguito da FTAI dopo 16h. In questo modo è possibile aumentare i tassi di gravidanza in caso di fallimento nell'applicazione del primo ovsynch e ridurre l'intervallo parto concepimento migliorando l'efficienza riproduttiva. (Fig. 4) (Neglia G. et al. 2018).

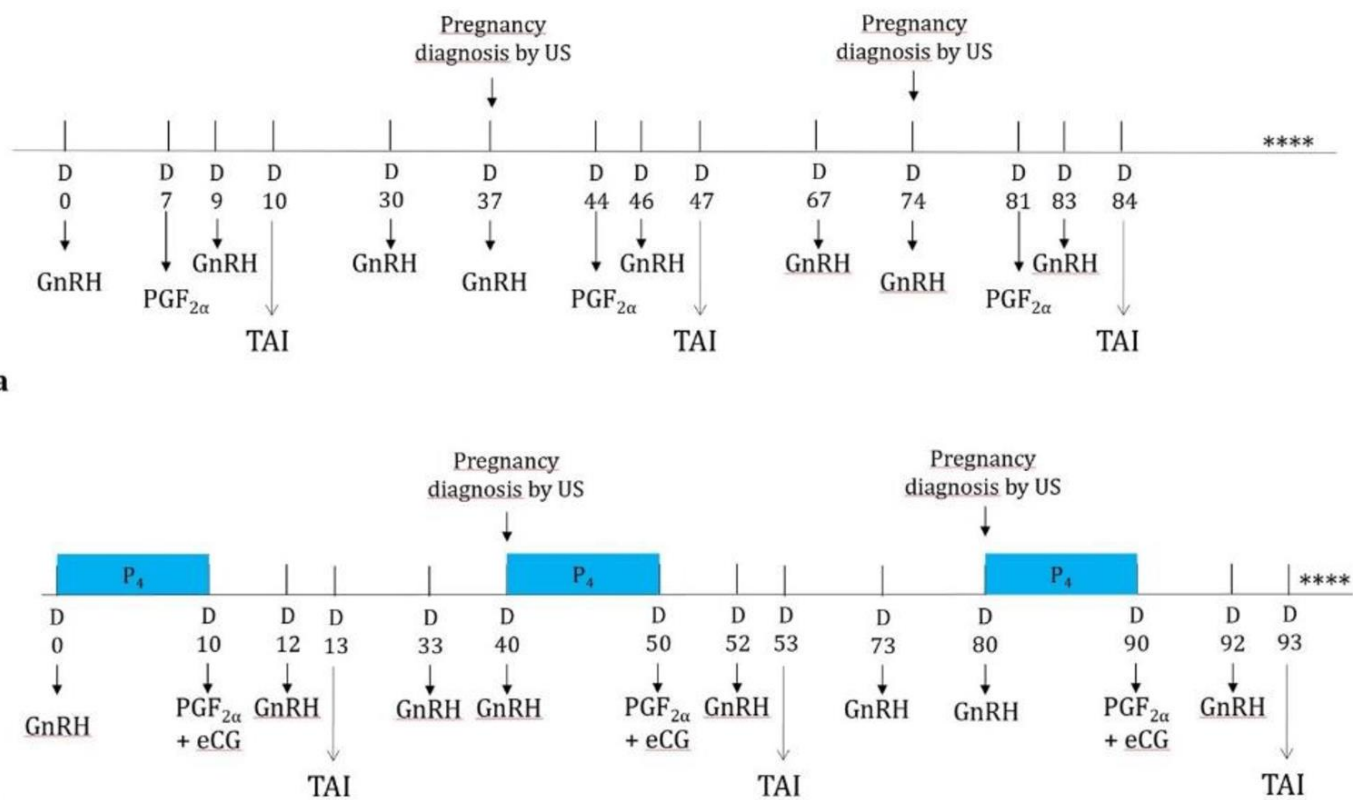


Figura 4: Schema di due protocolli di re-synch

### 1.3.3. MOET-MULTIPLE OVULATION EMBRYO TRANSFER

Il MOET è una tecnologia riproduttiva ampiamente utilizzata nella specie bovina per la produzione in vivo di embrioni. Il procedimento prevede l'abbinamento di un protocollo di super-ovulazione con il trasferimento embrionale (ET). La super-ovulazione è eseguita attraverso il trattamento ormonale con FSH ogni 12h a dosi scalari per 4-5d, che provoca lo sviluppo di tutti i follicoli di una ondata follicolare. In seguito a 3 giorni si esegue un trattamento con prostaglandina per eliminare un eventuale corpo luteo, e al giorno 5 si ha l'ovulazione dei follicoli. In seguito, si procede con l'inseminazione artificiale ogni 12h utilizzando in media 6 dosi inseminanti. Solitamente nelle bovine dopo 7 giorni si procede con il flushing per la raccolta delle formazioni, ma per le bufale la raccolta va anticipata a 5,5 – 6,5 giorni in quanto la crescita embrionale è più rapida di 24-36h rispetto alla specie bovina ( Misra et al. 1998). L'obbiettivo è raccogliere il maggior numero di morule e blastocisti, ovvero quelle formazioni che presentano ancora intatta la zona pellicida e che si prestano meglio al trasferimento post-congelamento. Le femmine

sottoposte al trattamento di superovulazione sono dette donatrici, mentre le femmine in cui sono trasferite le formazioni sono dette riceventi.

Attualmente il MOET è scarsamente applicato nella specie bufalina in quanto presenta un basso tasso di recupero embrionale (35%) con circa 1-3 embrioni vitali per raccolta. La scarsa efficienza di questa tecnologia riproduttiva nelle bufale è dovuta a diversi aspetti:

- una minore risposta al trattamento di super-ovulazione rispetto alla specie bovina
- ridotto numero di follicoli primordiali e di Graaf
- fallimento nella cattura degli oociti o del loro trasporto lungo l'ovidotto

(Baruselli et al. 2000, B. Gasparini 2002, Baruselli et al. 2020).

#### 1.3.4. PRODUZIONE IN VITRO DI EMBRIONI

Vista la scarsa efficienza nella produzione in vivo di embrioni nella specie bufalina, un metodo alternativo è la produzione in vitro di embrioni. Con questa pratica si effettua la raccolta di oociti da femmine di altro valore genetico, e in seguito si esegue maturazione, fertilizzazione in vitro per ottenere embrioni trasferibili mediante embryo transfer (ET).

La raccolta degli oociti può avvenire in due modi:

- prelievo di oociti provenienti da ovaie di bufale di fiume macellate (Hufana-Duran et al. 2004)
- Ovum pick-up (aspirazione ovocitaria trans-vaginale eco-guidata). Questa pratica prevede l'aspirazione dei follicoli antrali (>2mm) da entrambe le ovaie. L'aspirazione eco-guidata viene eseguita mediante un ecografo dotato di sonda convex trans-vaginale da 5MHz montata su un supporto con un ago solitamente lungo 50-55cm e con 17-18-gauge di diametro. Per prelevare i follicoli si usa una pompa del vuoto che applica costantemente una pressione negativa variabile in base alla macchina utilizzata (-40

mmHg, -70-80 mmHg, -110 mmHg) (R. Boni et al. 1996, Neglia G. et al. 2011, BM Manjunatha et al. 2008, Sakaguchi K. et al. 2019).

L'OPU a differenza del recupero degli oociti da ovaie di bufale macellate permette di eseguire più raccolte dalla donatrice, l'intervallo ideale in questo caso prevede due raccolte alla settimana a distanze alternate di 3-4d (BM Manjunatha et al. 2008).

In termini di oociti raccolti l'OPU nelle bufale permette di ottenere in media da 0,7 a 2,4 oociti per ovaia per sessione di raccolta, il che risulta significativamente inferiore rispetto alla specie bovina che permette di avere da 8-12 oociti di buona qualità per ovaia. La spiegazione di tale differenza è probabilmente riconducibile ad aspetti fisiologici della specie bufalina quali: ridotto numero di follicoli primordiali rispetto alle bovine (10000-20000 vs 150000), un minore numero di follicoli antrali durante il ciclo estrale e una maggiore incidenza di atresia follicolare (Gasparrini B. 2002).

Uno studio ha inoltre mostrato che nell'OPU è possibile anche l'utilizzo di trattamenti ormonali con FSH seguito da GnRH per andare a incrementare le dimensioni dei follicoli e migliorare la qualità degli oociti raccolti, incrementando la produttività del protocollo OPU-IVF (Sakaguchi K. Et al 2019).

I prodotti della raccolta mediante OPU sono detti "cumulus oocyte complexes" (COCs), e una volta trasportati al laboratorio vengono classificati in base all'uniformità del citoplasma e dal numero di strati di cellule che li circondano. Grade A e Grade B sono le categorie che presentano almeno 3 strati di cellule e citoplasma uniforme e vengono considerati adatti alla produzione in vitro. (Neglia G. et al 2003a).

I COCs selezionati vengono poi lavati e introdotti in goccioline di maturazione contenenti il medium di maturazione e vengono incubati a 38,5°C in atmosfera controllata (5% CO<sub>2</sub> con aria umidificata). Il grado di maturazione ideale per la fecondazione in vitro (IVF) è al completamento della meiosi nell'oocita, che tra le specie varia da 18-24h. Uno studio ha evidenziato come la maggior parte degli oociti nelle bufale completa la maturazione dopo 21-24h dall'inizio dell'IVM ("in vitro maturation") (Gasparrini B. et al 2008).

Per quanto riguarda il processo di fecondazione in vitro, questo presenta tassi di successo molto variabile influenzati da: la qualità del seme, il medium utilizzato e la durata del processo. (Suresh et al. 2009). La capacitazione del seme per la fertilizzazione in vitro può essere ottenuta attraverso diversi medium come ad esempio "BO solution" (Bracket and Oliphant solution) contenete 10mM di caffeina e 4 unità di eparina/ml (Hufana-Duran D. et al. 2004), e la fertilizzazione in vitro (IVF) va eseguita tra le 18-24h post IVM, con un tempo di co-incubazione sperma-oocita di 16h (Gasparrini B. 2008). Un ulteriore studio ha anche dimostrato la possibilità nell'utilizzo di seme sessato per l'IVF ottenendo la produzione di due embrioni sessati che hanno portato alla nascita di due soggetti entrambi del sesso pre-selezionato (due femmine) (Lu Y.Q. et al. 2007).

A seguito della fertilizzazione in vitro si ha la coltura in vitro degli embrioni (IVC), la quale richiede un ambiente adeguato (temperatura, umidità e gas) e i nutrienti necessari affinché gli ovociti fecondati possano svilupparsi allo stadio di blastocisti. Per l'IVC esistono vari terreni di coltura la cui composizione normalmente apporta nutrienti, fattori di crescita e antiossidanti per promuovere lo sviluppo degli embrioni (Gasparrini B. 2002, Suresh et al. 2009).

Infine, per la conservazione degli embrioni, nella specie bufalina è utilizzabile sia il congelamento che la vetrificazione. In merito al congelamento, in uno studio gli embrioni sono stati congelati mediante lento raffreddamento utilizzando glicerolo 10% oppure glicole etilenico 1,5M come crioprotettori (Galli C. et al. 2011). Per la vetrificazione invece il protocollo solitamente prevede una vetrificazione in due step utilizzando solitamente come crioprotettori glicole etilenico e dimetilsolfossido (Manjunatha B.M. Et al. 2009).

## 1.4. USO DELL' ECOGRAFIA NELLE BUFALHE

L'ecografia è una semplice, accurata e non invasiva tecnica diagnostica. L'applicazione di questa tecnologia si basa sull'utilizzo di ultrasuoni che vengono emessi da una sonda attraverso un trasduttore (cristalli), gli ultrasuoni attraversano i tessuti, i quali in risposta emettono degli echi. Gli echi emessi dai

tessuti sono poi ricevuti dal trasduttore, processati e visualizzati in immagini. Il grado di echi emessi dai tessuti varia in base alla loro compattezza. Tessuti molto compatti sono iper-ecogenici, tessuti poco compatti sono ipo-ecogenici, mentre i liquidi risultano anecogeni.

L'uso dell'ecografia ha trovato grande applicazione in ambito veterinario, partendo da un uso inizialmente limitato alla diagnosi di gravidanza e per l'individuazione di determinate patologie, fino ad essere lo strumento diagnostico più efficiente per il monitoraggio della salute riproduttiva sia dei maschi che delle femmine, e per la gestione della riproduzione all'interno della mandria. Inoltre, negli ultimi anni diverse tecnologie riproduttive hanno tratto ampi benefici nell'implementazione dell'ecografia.

Attualmente nelle bufale l'ecografia viene utilizzata per (Terzano G.M 2012):

- monitoraggio delle ovaie
- determinazione della pubertà
- monitoraggio follicolare per diagnosi o per l'applicazione di trattamenti farmacologici
- determinazione della presenza di follicoli ovulatori e del tempo di ovulazione
- determinazione di condizioni anovulatorie
- monitoraggio del corpo luteo
- determinazione della fase del ciclo estrale
- individuazione del tempo ottimale per l'inseminazione artificiale
- raccolta degli oociti tramite OPU
- monitoraggio delle riceventi per embryo transfer
- diagnosi precoce di gravidanza
- caratterizzazione della crescita embrionale
- determinazione di vitalità, età, genere e numero di feti
- monitoraggio dell'involutione uterina nel post-parto
- determinazione del tasso di mortalità embrionale

Per l'ecografia vi sono 3 tipi di sonde: lineare, settoriale e convex. La sonda lineare fornisce immagini rettangolari ed è utilizzata per le ecografie trans-rettali.

La sonda settoriale invece è usata per ecografie attraverso aperture strette come ad esempio gli spazi intercostali. Infine, la sonda convex produce immagini a forma di cono ed è utilizzata per l'aspirazione ovocitaria trans-vaginale nei grandi animali come bovine e bufale.

Le strumentazioni generalmente presentano uno spettro di frequenze che va da 2.0MHz a 10.0MHz, e tipicamente per le sonde lineari e convex si utilizzano frequenze da 2.0MHz a 6.0MHz, mentre per quelle lineari da 5.0-10MHz. (Zambrano-Vàron J. 2015).

Esistono varie modalità di ecografia che possono essere eseguite: Real time B-mode, A-mode (amplitude mode), M-mode (motion mode) e Doppler.

La Real time B-mode permette una visualizzazione bidimensionale dell'ecografia, dove le intensità degli echi sono rappresentate attraverso una modulazione della luminosità (Brightness, B) dei pixels, dove il nero indica anecogenicità, mentre il bianco individua strutture iperecogene. L'ecografia B-mode fornisce numerose informazioni in un breve periodo di tempo, permettendo una diagnosi anatomica dinamica, in quanto produce rapidamente una serie di immagini bidimensionali in sequenza dando un'idea dell'analisi della struttura in tempo reale. In questo tipo di ecografia i segnali sono continuamente trasmessi, ricevuti e processati, permettendo un aggiornamento continuo dell'immagine dell'organo. Questo metodo ecografico è ampiamente utilizzato per l'esame dei tratti riproduttivi di bovini e altri grandi animali tra cui le bufale.

La A-mode invece, produce una visualizzazione unidimensionale delle ampiezze dell'eco per varie profondità (depth o time), e viene rappresentata come un grafico a linee in cui i due assi sono ampiezza e profondità. L'utilizzo principale riguarda la valutazione delle porzioni grasse e magre negli animali da carne.

La M-mode o "motion mode" al contrario è un adattamento della B-mode, che si usa per esaminare strutture in movimento come il cuore. Infine, il Doppler utilizza il movimento del sangue verso o lontano rispetto al trasduttore per costruire immagini multicolore dei modelli di flusso (rosso= verso il trasduttore, blu=lontano dal trasduttore). L'analisi con l'eco-doppler è utilizzata per valutare il flusso sanguigno di diverse strutture come, ad esempio, il corpo luteo (King A.M. 2006).



## 1.5. ANALISI IMMAGINI ECOGRAFICHE

### 1.5.1 Ecografia delle ovaie

Le ovaie della specie bufalina hanno una forma ovoidale e durante il periodo di anestro presentano una ecogenicità omogenea, mentre nella stagione riproduttiva si possono individuare due strutture di diversa ecogenicità: i follicoli e il corpo luteo.

I follicoli a livello ecografico si caratterizzano per una forma rotondeggiante, contenute fluido anecogeno (nero) circondato da un sottile strato ecogenico (Fig. 5.1). Il corpo luteo invece presenta una ecogenicità variabile in funzione del ciclo estrale ed è identificabile a partire dal terzo giorno dopo l'ovulazione. Solitamente un corpo luteo maturo presenta un diametro tra 13-16mm e una struttura ecogenica grigia con una linea di demarcazione ben definita tra il tessuto luteale e lo stroma ovarico (Fig. 5.2). In aggiunta, il corpo luteo può presentare anche una cavità interna contenente del liquido ed in questo caso si parla di corpo luteo cavitario.

Come detto precedentemente il corpo luteo nelle bufale è più piccolo rispetto alla specie bovina e spesso non protrude dal parenchima dell'ovaia, per cui è difficilmente individuabile mediante palpazione trans-rettale. Per questo motivo l'ecografia diventa uno strumento indispensabile al fine di individuare il corpo luteo e valutare lo stato della ciclicità degli animali, per poter poi procedere a protocolli di sincronizzazione, trattamenti di superovulazione, trasferimento embrionale oppure per diagnosticare situazioni anovulatorie o di anestro stagionale.

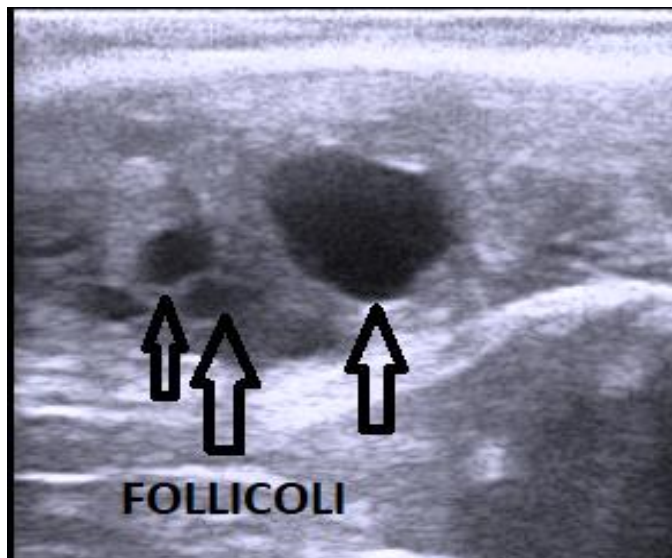


Figura 5.1: Immagine ecografica dei follicoli

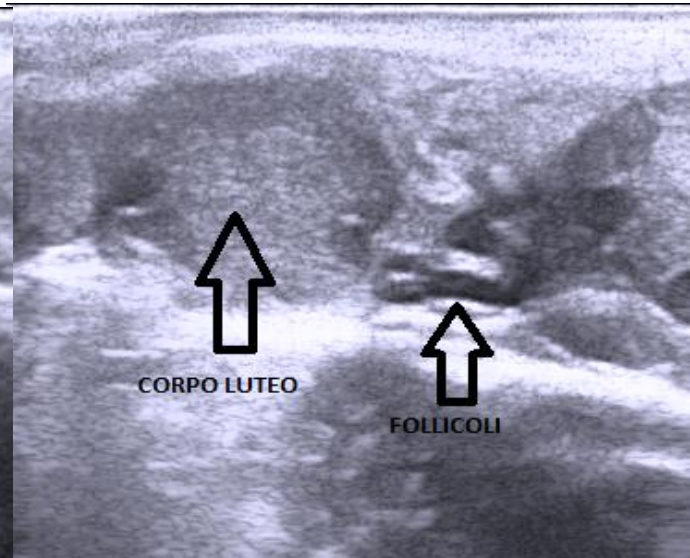


Figura 5.2 : Corpo luteo con follicoli

### 1.5.2. Cisti ovariche

Le cisti ovariche sono una delle patologie riscontrabili a livello delle gonadi femminile nelle bufale e consistono in strutture follicolari anovulatorie, ovvero strutture follicolari che sviluppandosi hanno superato le dimensioni ovulatorie senza andare ad ovulare. La definizione comune di ciste fa riferimento ad una struttura follicolare con diametro superiore a 2,5cm e che persiste per almeno 10d in assenza di un corpo luteo. Le cisti possono essere classificate in due categorie (Garverick H.A. 1997):

- cisti follicolari, che sono caratterizzate da anecogenicità centrale per la presenza di fluido, una sottile parete circondante la struttura e scarsa secrezione di progesterone (Fig. 6.1)
- cisti luteiniche, che presentano anch'esse anecogenicità nella parte centrale per la presenza di liquido, ma si differenziano per una parete più spessa, dovuta alla luteinizzazione delle cellule della teca o della granulosa o entrambe, e per una maggiore secrezione di progesterone (Fig. 6.2)

Diversi studi hanno evidenziato che l'incidenza di cisti nella specie bufalina va da 0,5% a 2,7%, con maggiore frequenza di cisti follicolari rispetto alle cisti luteali. (Purohit G.N. 2014).

Le cause dell'insorgenza di una degenerazione cistica vengono spesso collegate a alterazioni nelle funzioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie.

Solitamente le cellule che rivestono la cisti follicolare sintetizzano estrogeni che, in alcuni casi, determinano nell'animale segni clinici di ninfomania. Inoltre, come detto precedentemente le cisti possono produrre anche progesterone, in particolare quelle luteali, e questo può portare l'animale in anestro, in quanto va a influenzare la secrezione di gonadotropine. (Peter AT 2004).

La diagnosi di cisti ovariche si basa sulla dimensione di queste strutture (>2,5cm) e sulla loro consistenza (piene di liquido) e viene eseguita mediante palpazione trans-rettale oppure tramite ecografia, mentre la terapia prevede trattamenti con GnRH o hCG (Purohit G.N. 2014).

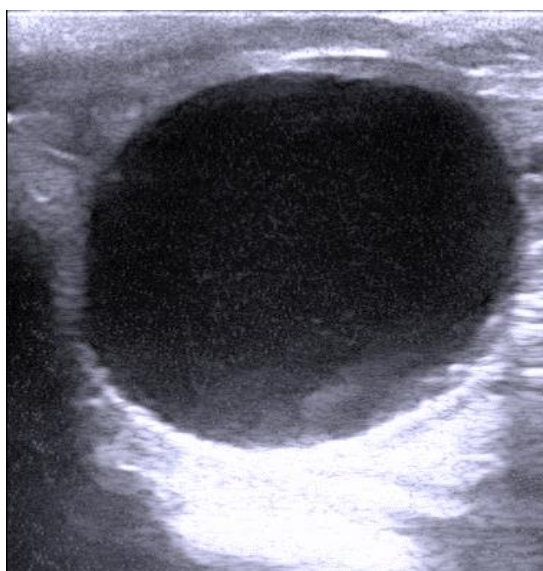


Figura 6.1 : Immagine ecografica di una Cisti follicolare

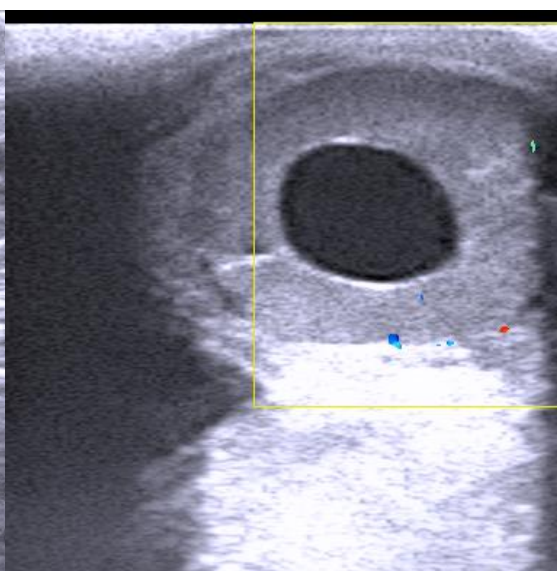


Figura 6.2: Immagine ecografica di cisti luteale con evidente luteinizzazione della parete

### 1.5.3 Ecografia dell'utero e diagnosi di gravidanza

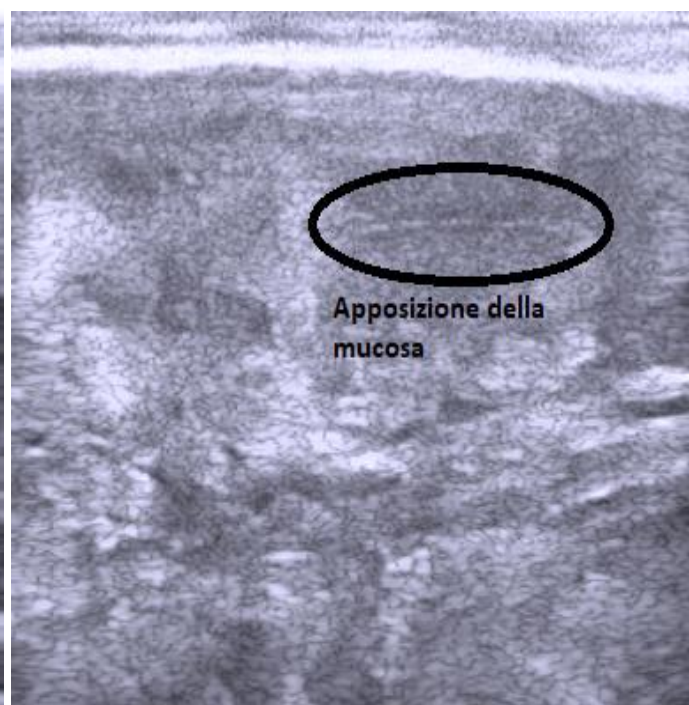
Come detto precedentemente l'utero delle bufale ha un corpo più corto di quello bovino e presenta delle corna più convolute, inoltre la cervice è più corta e tortuosa, in quanto presenta tre anelli cervicali.

L'utero nell'ecografia è valutato in base a diversi parametri come ecogenicità, vascolarizzazione e edema della parete uterina, come anche presenza o meno di liquido. Solitamente l'ecogenicità della parete uterina aumenta durante l'estro per un aumento del tono uterino, mentre la vascolarizzazione e l'edema sono visibili come aree non ecogeniche all'interno della parete uterina (DesCôteaux Luc et al 2009).

L'utero in assenza di gravidanza può essere considerato come una cavità "virtuale" ed è particolarmente identificabile attraverso l'individuazione dell'apposizione della mucosa uterina che si identifica attraverso una linea iperecogena (Fig. 7.1, Fig. 7.2).



*Figura 7.1: Immagine ecografica della sezione corno uterino non gravido*



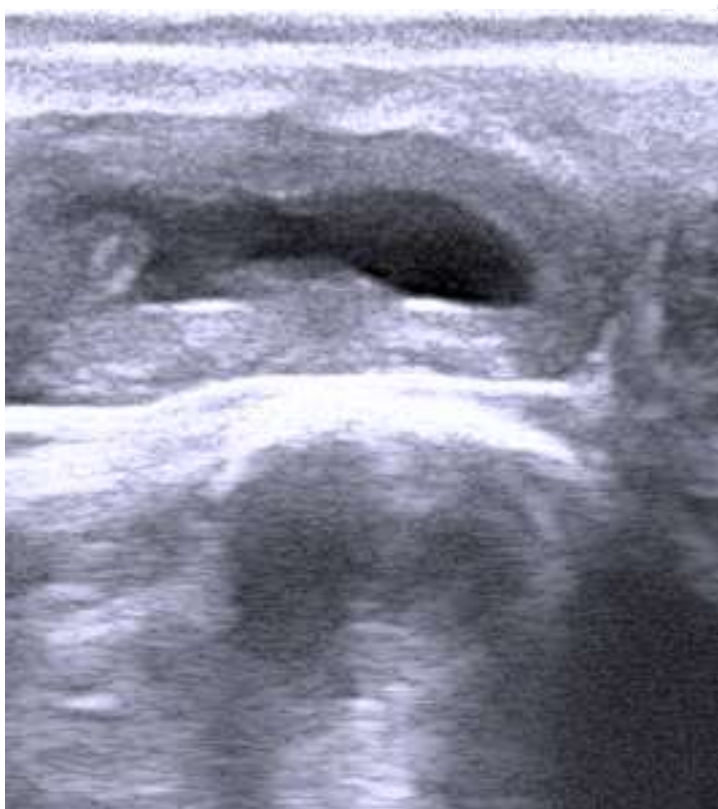
*Figura 7.2: Immagine ecografica di un utero non gravido*

La diagnosi di gravidanza mediante ecografia può essere effettuata a partire da 26-27d di gestazione a differenza della diagnosi mediante palpazione transrettale delle corna uterine che può essere eseguita a partire da 33d di gestazione. L'ecografia consente quindi una riduzione dei tempi nell'individuazione di mancati



concepimenti determinando una maggiore efficienza nella gestione della riproduzione. L'immagine ecografica di una diagnosi di gravidanza precoce individua fluido anecogeno all'interno del corno uterino (Fig. 8.1).

La presenza dell'embrione all'interno della cavità conferma la diagnosi, ma va comunque monitorata la vitalità embrionale tramite visualizzazione del battito cardiaco (Fig. 8.2).



*Figura 8.1: Immagine ecografica che mostra presenza di fluido anecogeno nell'utero*



*Figura 8.2: Immagine ecografica di un embrione all'interno dell'utero*

#### **1.5.4. ImageJ**

ImageJ è un programma Java di elaborazione delle immagini di pubblico dominio. Questo software è in grado di visualizzare, analizzare, processare, salvare e stampare immagini di 8-bit, 16-bit e 32-bit. Può leggere vari tipi di formati e anche “stacks”, ovvero serie di immagine che condividono un'unica finestra, inoltre permette di eseguire più operazioni in parallelo.

L'uso di ImageJ consente:

- calcolo di aree e valori statistici dei pixel di determinate parti di immagini selezionate dall'operatore
- può misurare distanze e angoli
- può creare istogrammi di densità e grafici lineari
- supporta funzioni standard di elaborazione delle immagini come manipolazione del contrasto, della nitidezza, l'arrotondamento, il rilevamento dei bordi e il filtraggio mediano
- esegue trasformazioni geometriche come ridimensionamento, rotazione e ribaltamenti
- l'immagine può essere ingrandita fino a 32:1 o ridotta a 1:32

Il programma supporta qualsiasi numero di immagini (finestre) contemporaneamente, limitato solo dalla memoria disponibile. Inoltre, il software è stato progettato con un'architettura aperta che fornisce la possibilità di aggiungere estensioni attraverso Java plugin (imageJ.nhi.gov).

## 2. MATERIALI E METODI

L'argomento di questa tesi si basa sulla caratterizzazione dell'ecotessitura dei corpi lutei nelle bufale. In questo caso lo studio è stato suddiviso in due parti, nella prima parte sono stati messi a confronti i dati raccolti in merito a dimensioni e caratteristiche ecotessiturali di corpi lutei gravidici e non. Nella seconda parte invece, sono state confrontate le dimensioni e l'ecotessitura dei corpi lutei analizzati con dati ottenuti eseguendo le stesse analisi su cisti follicolari e luteali. Per questo studio sono stati analizzati 52 corpi lutei (CL=corpus luteum) di bufale di razza Mediterranea Italiana allevate in Veneto presso l'allevamento "Azienda Agricola Tre Case srl" situata nel comune di Valcasoni, a Caorle, in provincia di Venezia. Le ecografie esaminate per individuare i corpi lutei sono state raccolte tra febbraio del 2011 e luglio del 2015. Lo scopo di tali ecografie era la diagnosi di gravidanza a seguito del protocollo di sincronizzazione delle ovulazioni. Le bufale venivano quindi sottoposte ad ov-synch e al ventunesimo giorno si iniziava col re-synch (somministrazione GnRH), indipendentemente dal fatto che

avessero manifestato o meno il calore. Così facendo, al ventisettesimo giorno con l'ecografia se l'animale fosse stato gravido si sarebbe interrotto il re-synch, se invece non vi fosse stata gravidanza, si sarebbe somministrato prostaglandina e due gironi dopo GnRH seguito poi da FTAI.

Le ecografie sono state eseguite per via trans-rettale utilizzando un ecografo Real-time B-mode con sonda lineare, utilizzando frequenze di 7.5-10.0MHz.

Oltre ai corpi lutei sono state anche analizzate anche 19 cisti ovariche, di cui 12 cisti follicolari (FC=follicular cyst) e 7 cisti luteali (LC= luteal cyst).

L'analisi delle ecografie è stata eseguita mediante il software imageJ. I dati raccolti sono stati organizzati in un file excel e in seguito sono stati determinati i parametri calcolabili ed è stata poi eseguita l'analisi grafica dei dati ottenuti.

I parametri considerati sia per i corpi lutei che per le cisti sono stati:

- asse maggiore
- asse minore
- volume
- conta dei pixels (pixels count)
- Intensità media dei pixels e deviazione standard
- istogramma dell'intensità dei pixels (pixels grey intensity) rappresentato attraverso una scala dei grigi da 0 (nero) a 255 (bianco)

Le rappresentazioni grafiche presentate in questo studio si distinguono in confronto tra corpi lutei (gravidici e non) e comparazione tra corpi lutei e cisti.

## 2.1. ANALISI E ELABORAZIONE DATI

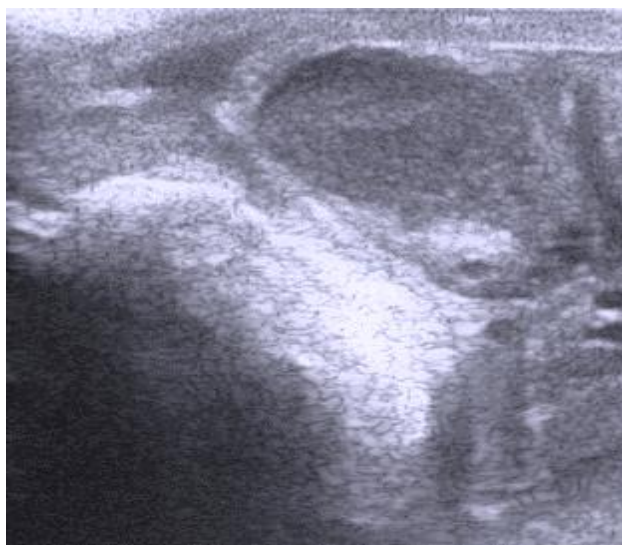
### 2.1.1. DETERMINAZIONE CORPI LUTEI GRAVIDICI E NON

Per determinare se un corpo luteo risultasse gravidico, non sono state eseguite analisi dei livelli di progesterone, ma sono state utilizzate le immagini ecografiche. Dato che le ecografie raccolte avevano l'obbiettivo di determinare o meno l'avvenuto concepimento, all'interno delle cartelle di ciascun animale si potevano trovare ecografie delle ovaie con il corpo luteo accompagnate da ecografie

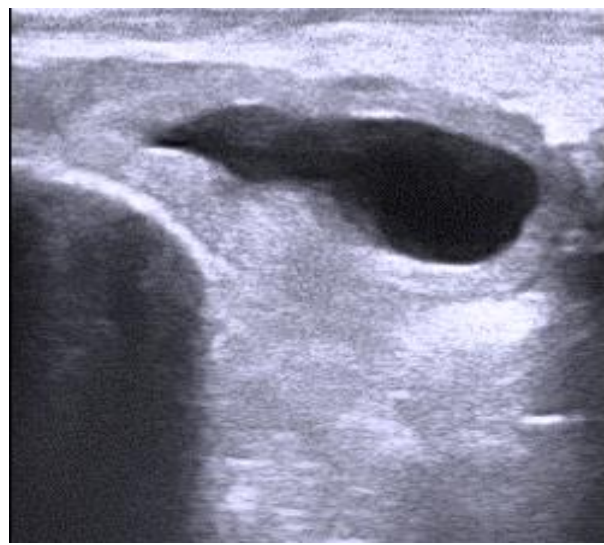
dell'utero che potevano evidenziare o meno la gravidanza (Fig 9.1, Fig 9.2, Fig. 9.3).

Sulla base di questo i corpi lutei nel file sono stati contrassegnati con:1 = CL gravidico,2= CL non gravido. Nel caso vi fossero cartelle contenenti immagini di corpi lutei ma prive di ecografie uterine da cui stabilire o meno la gravidanza, questi corpi lutei sono stati contrassegnati con 0 = dato mancante.

In totale sono stati individuati 9 corpi lutei gravidici 39 corpi lutei non gravidici e 4 corpi lutei con dato assente.

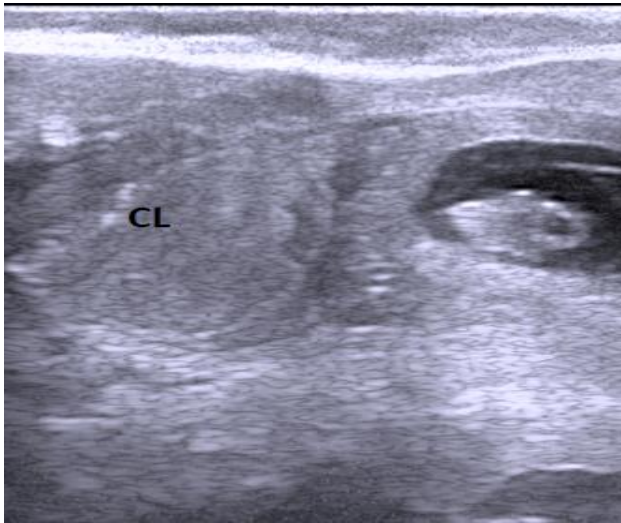


*Figura 9.1: Immagine ecografica del corpo luteo gravidico della bufala dell'immagine 9.2*



*Figura 9.2: Immagine ecografica dell'utero della bufala dell'immagine 9.1*





*Figura 9.3: Immagine ecografica che mostra sia l'embrione sia la presenza di un corpo luteo gravidico*

### **2.1.2. DETERMINAZIONE DEGLI ASSI**

Per la determinazione delle dimensioni dei corpi lutei e delle cisti, in questo studio è stata fatta l'assunzione che abbiano una forma bidimensionale ellittica.

Sulla base di questo assunto, attraverso il software imageJ si è calcolata la lunghezza dei due assi: asse maggiore e asse minore (Fig.10).

Le lunghezze calcolate con imageJ vengono però espresse in pixels, per cui per convertirle in cm, sempre mediante imageJ, per ogni immagine ecografica è stato calcolato quanti pixels corrispondono ad 1cm (Fig. 10).

In questo modo è stato poi possibile calcolare entrambe le lunghezze degli assi in centimetri attraverso la formula di conversione:

Lunghezza in cm = lunghezza in pixels / numero di pixels corrispondenti ad 1cm

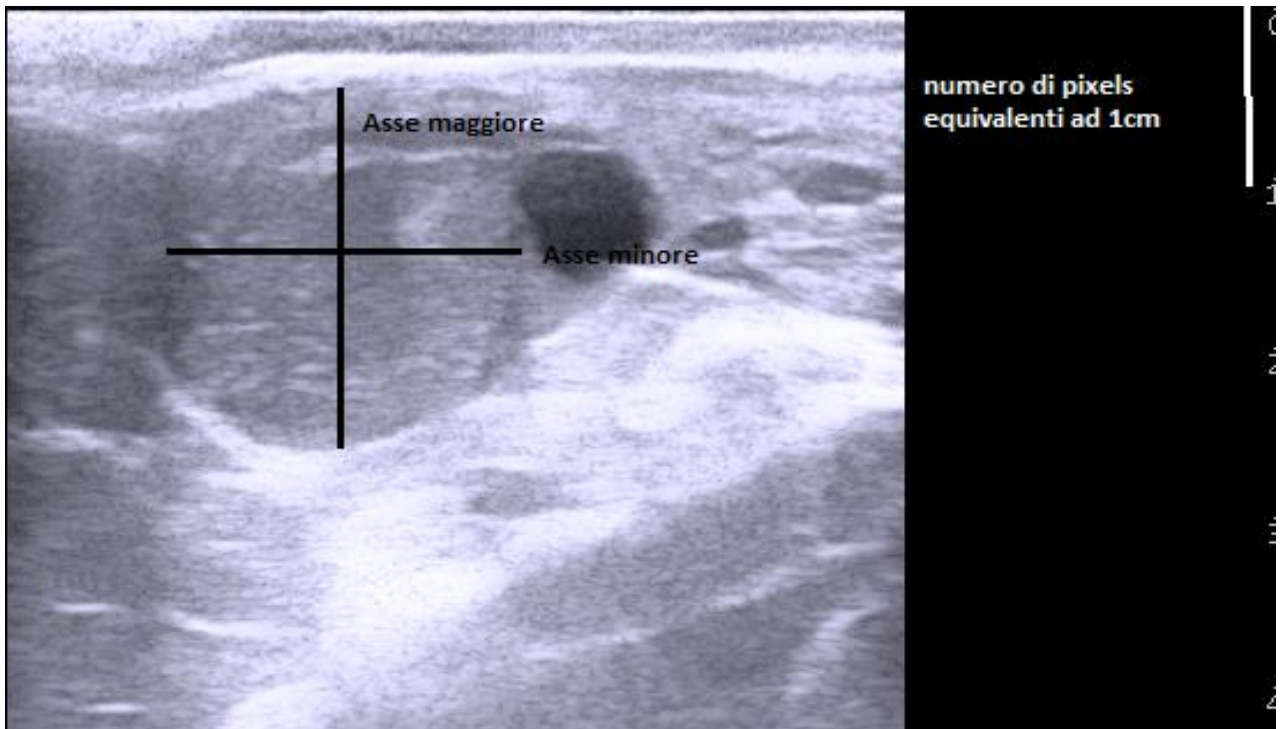


Figura 10: Lunghezze rilevate tramite imageJ su un'immagine ecografica di un corpo luteo

### 2.1.3.DETERMINAZIONE DEL VOLUME

Per il calcolo del volume del corpo luteo e delle cisti in questo studio si è fatta l'assunzione che queste strutture abbiano la forma tridimensionale di un ellissoide.

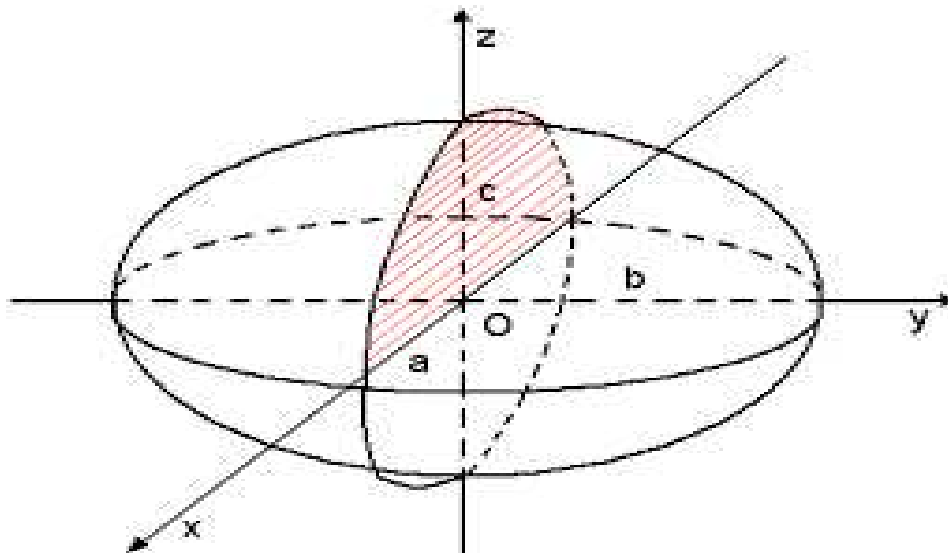


Figura 11: Rappresentazione dell'ellissoide e dei suoi assi di simmetria

L'ellissoide è una figura algebrica che costituisce l'analogo in tre dimensioni dell'ellisse. Presenta un centro di simmetria con tre assi e tre piani di simmetria a due a due ortogonali. L'ellissoide interseca gli assi cartesiani in 3 coppie di punti simmetrici rispetto all'origine, detti vertici. I segmenti che congiungono ciascuna coppia di vertici sono gli assi dell'ellissoide e hanno lunghezza  $2a$ ,  $2b$  e  $2c$ .

Il volume dell'ellissoide viene calcolato attraverso la formula  $V = \frac{4}{3} \pi abc$ .

In questo studio, gli assi calcolati corrispondono a due degli assi dell'ellissoide:  $2b =$  asse maggiore e  $2c =$  asse minore. Per il calcolo del volume, essendo l'immagine ecografica bidimensionale, noi non disponiamo della misura di "a", per cui assumiamo che "a" sia uguale a "c".

Sulla base di queste assunzioni quindi la formula del volume che è stata utilizzata equivale a:

$$V = \frac{4}{3} \pi \times (\text{Lunghezza asse maggiore}/2) \times (\text{Lunghezza asse minore}/2)^2$$

### 2.1.3. DETERMINAZIONE DATI ECOTESSITURA

Per la determinazione dei parametri che permettono la caratterizzazione dell'ecotessitura è stato utilizzato anche qui il software imageJ.

ImageJ durante l'analisi di immagini, come quelle ecografiche, permette di andare a selezionare determinate sezioni dell'immagine. In questo studio il software è stato quindi applicato per andare a circoscrivere le strutture di interesse (corpi lutei e cisti) calcolando area e intensità dei pixels.

L'analisi di questi dati viene rappresentata attraverso un istogramma (Fig.12).

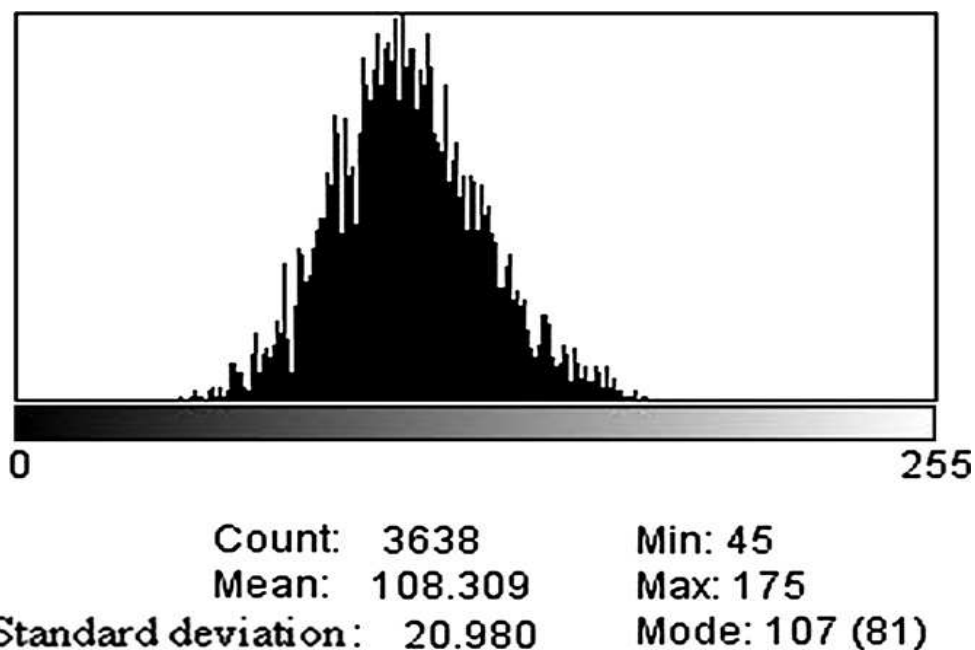


Figura 12: Immagine dell'istogramma di intensità dei pixels prodotto da imageJ che riporta conta dei pixels, intensità media e deviazione standard

L'istogramma rappresenta la distribuzione dei pixels in base alla loro intensità, la quale viene misurata secondo una scala di intensità dei grigi che va da 0 (nero) a 255 (bianco). Oltre alla rappresentazione grafica, l'analisi riporta anche la conta dei pixels (pixels count), che corrisponde al numero di pixels contenuti nella struttura selezionata (area), l'intensità media dei pixels e la deviazione standard di tale intensità.

Inoltre, per ciascun corpo luteo e ciste analizzata nella raccolta dati, oltre alla conta dei pixels e all'intensità media è stato riportato anche l'istogramma di intensità dei pixels.

### 3. RISULTATI

I risultati ottenuti relativi alla misurazione delle lunghezze degli assi e del calcolo del volume sono poi stati organizzati in tabelle. Per ogni tabella i valori sono stati

suddivisi inizialmente tra le tre categorie di corpi lutei individuate (corpi lutei gravidici 1, corpi lutei non gravidici 2, e corpi lutei con dato di gravidanza mancante 0), e successivamente suddivisi tra totale dei corpi lutei ( CL Tot), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC) (Tab.1, Tab.2, Tab.3). Successivamente per verificare se vi fossero differenze statisticamente significative è stato fatto un confronto grafico di tutte e tre le misure, inizialmente tra le categorie di corpi lutei individuate, e successivamente tra corpi lutei e cisti (Grafico1.1, Grafico1.2, Grafico2.1, Grafico2.2, Grafico3.1, Grafico3.2).

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dall'analisi dell'ecotessitura (conta dei pixels e intensità media dei pixels), anch'essi sono stati organizzati in tabelle con suddivisione analoga a quella utilizzata per le misurazioni degli assi e del volume (Tab.4, Tab.5). Successivamente per verificare se vi fossero differenze statisticamente significative, anche qui è stato fatto un confronto grafico tra conta dei pixels e intensità media dei pixels, inizialmente tra le tre categorie di corpi lutei individuate (0, 1, 2), e poi tra corpi lutei, cisti follicolari e cisti luteiniche (Grafico4.1, Grafico4.2, Grafico5.1, Grafico5.2).

Poi, per osservare le differenze nella distribuzione dell'intensità dei pixels è stato fatto un confronto grafico tra la media degli istogrammi di intensità dei pixels, prima tra le categorie di corpi lutei individuate (Grafico 6), e in seguito tra corpi lutei, cisti follicolari e cisti luteali (Grafico 7).

Infine, un ulteriore confronto grafico è stato fatto tra la media degli istogrammi di intensità dei pixels dei corpi lutei gravidici (CL gravidico) e la media degli istogrammi di intensità dei pixels delle cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC) (Grafico 8).

Tabella 1: Dati della lunghezza dell'asse maggiore (cm) di: corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0), totale dei corpi lutei (CL Tot), cisti follicolare (FC), cisti luteale (LC).

Struttura	Gravidanza	Massimo	Minimo	Media	Dev. st.
CL	0	2,37	1,43	1,90	0,47
	1	2,25	1,65	1,95	0,30

	2	2,08	1,20	1,64	0,44
CL	Tot	2,15	1,28	1,71	0,44
FC		4,45	2,37	3,41	1,04
LC		3,28	1,82	2,55	0,73

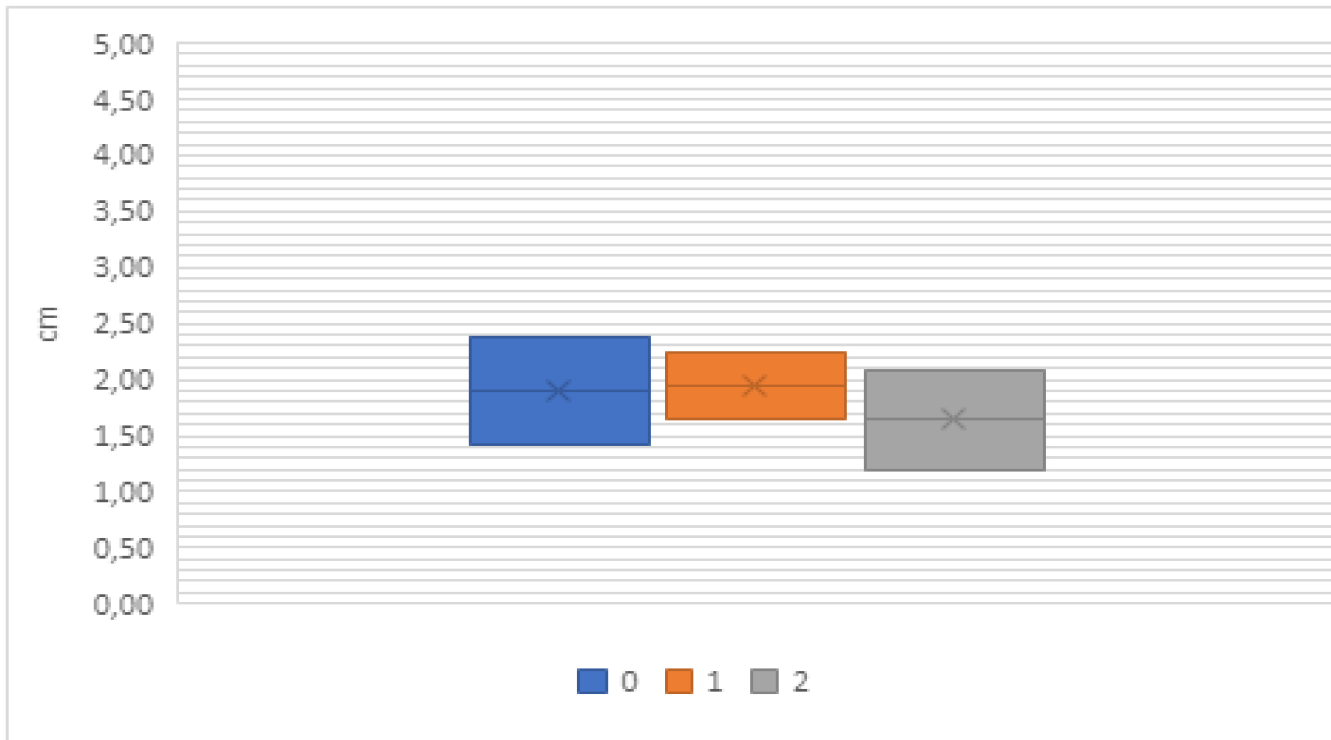


Grafico 1.1: Confronto grafico della lunghezza dell'asse maggiore di corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), e corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0).

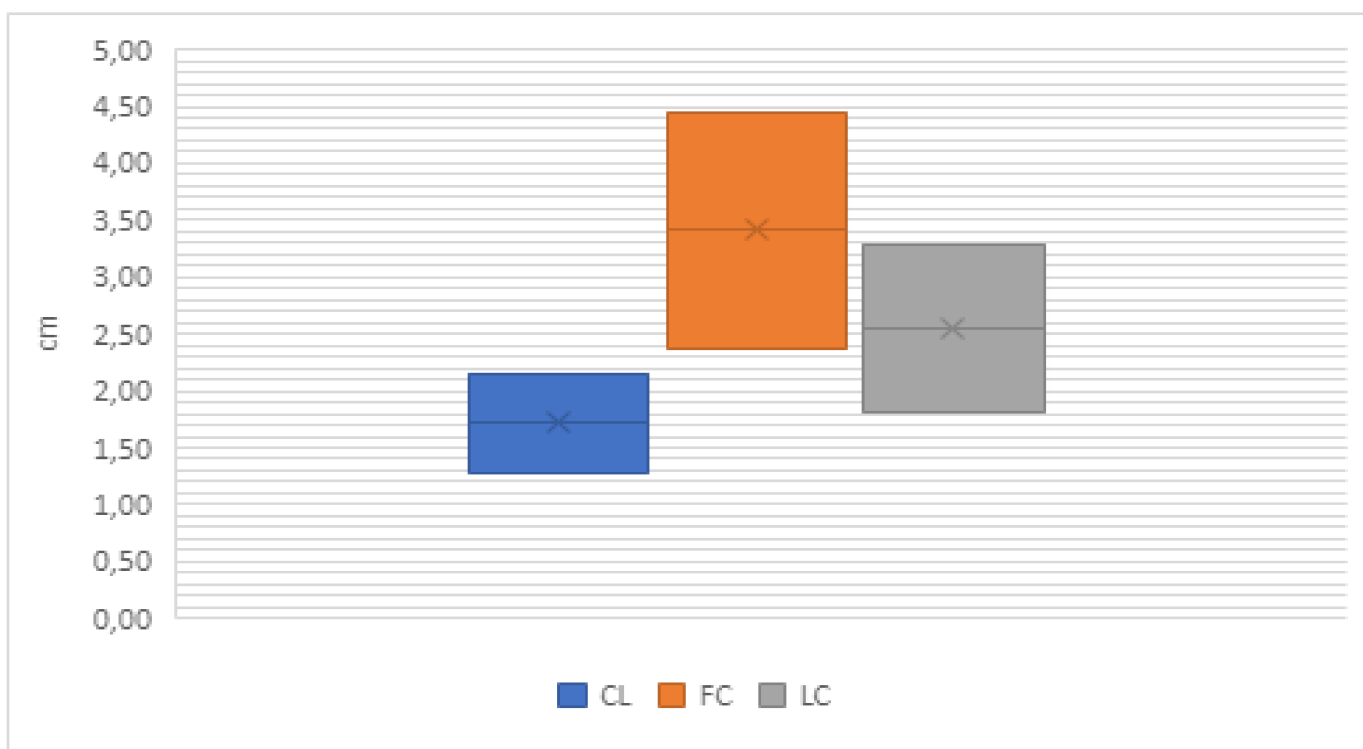


Grafico 1.2: Confronto grafico della lunghezza dell'asse maggiore tra corpi lutei(CL), cisti follicolari(FC) e cisti luteali(LC).

Tabella 2: Dati della lunghezza dell'asse minore (cm) di: corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante, (0) totale dei corpi lutei (CL Tot), cisti follicolari (FC), e cisti luteali (LC).

Struttura	Gravidanza	Massimo	Minimo	Media	Dev. st.
CL	0	1,30	0,97	1,13	0,16
	1	1,96	1,21	1,59	0,37
	2	1,48	0,80	1,14	0,34
CL	Tot	1,59	0,84	1,22	0,38
FC		3,66	1,97	2,81	0,84
LC		2,81	1,57	2,19	0,62

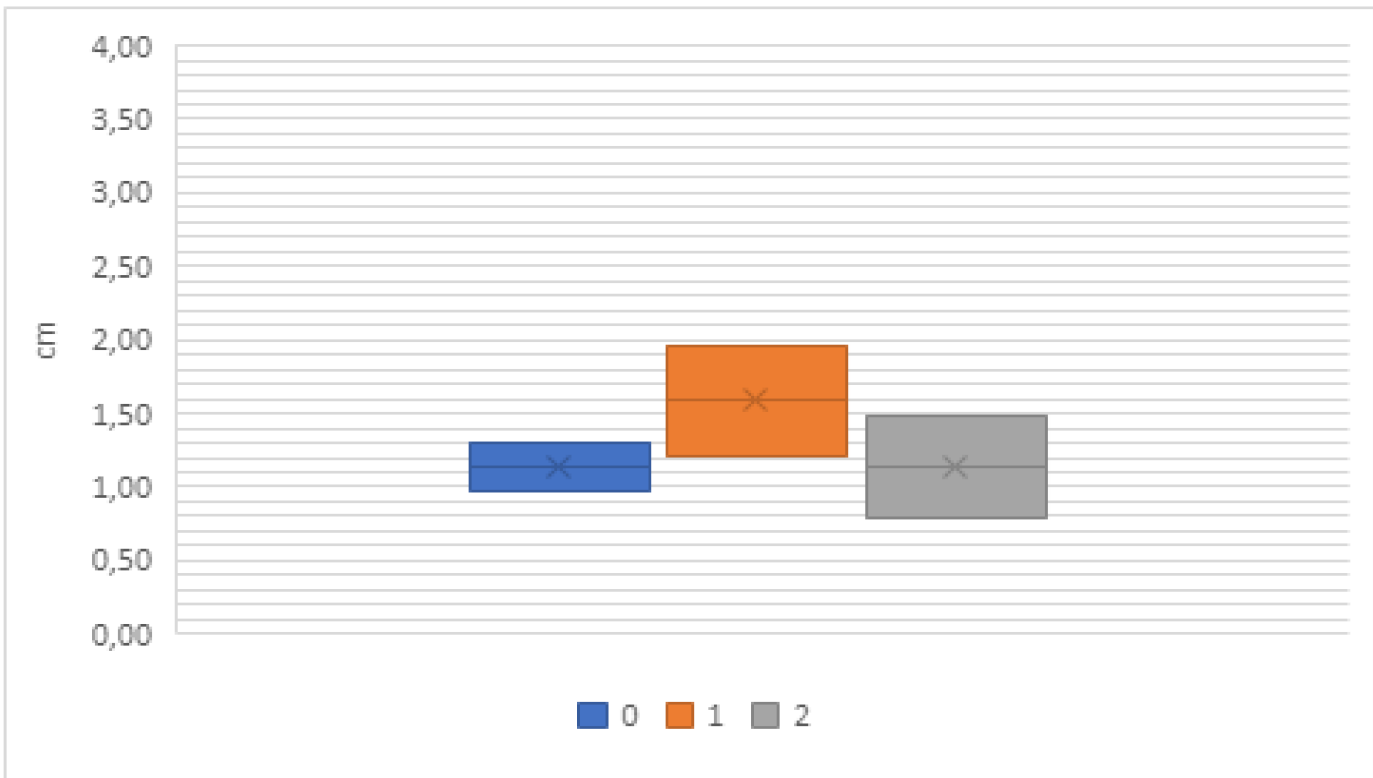


Grafico 2.1: Confronto grafico della lunghezza dell'asse minore tra corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici(2) e corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0).



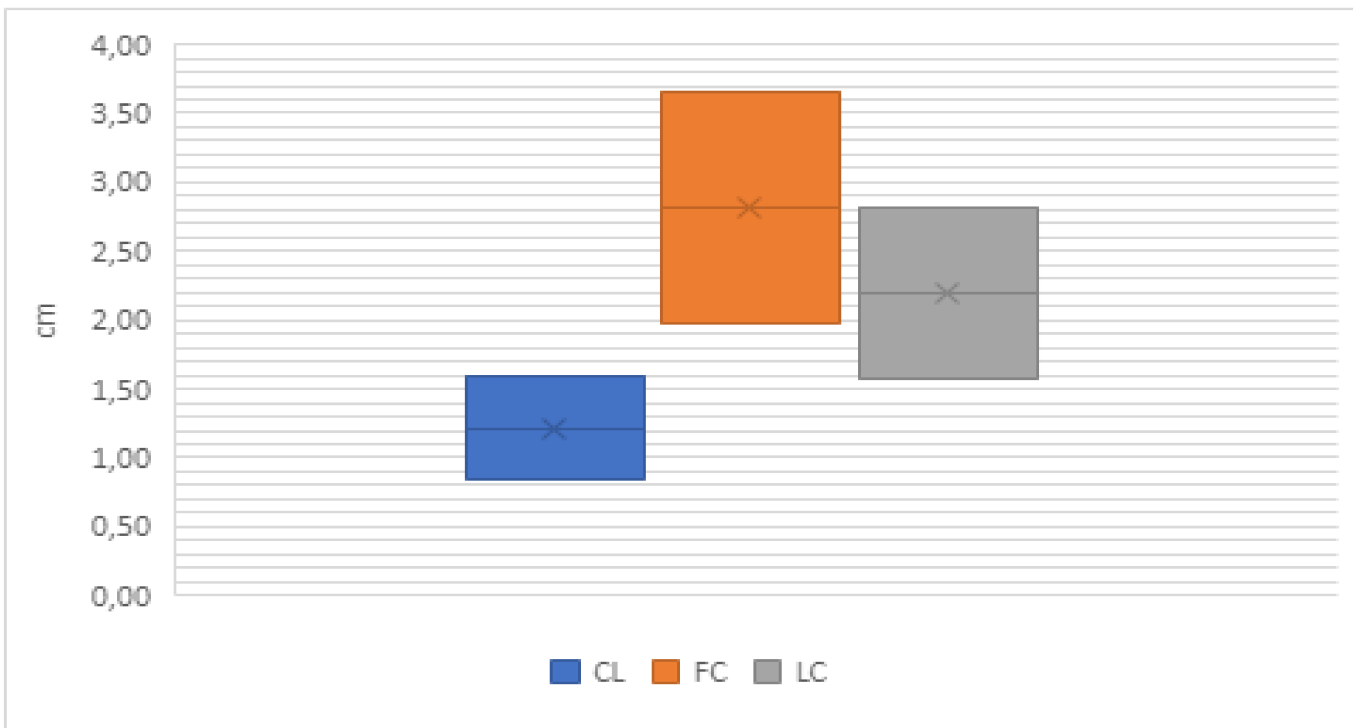


Grafico 2.2: Confronto grafico della lunghezza dell'asse minore tra corpi lutei (CL), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

Tabella 3: Dati del volume (cm<sup>3</sup>) di: corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0), totale dei corpi lutei (CL Tot), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

Struttura	Gravidanza	Massimo	Minimo	Media	Dev. st.
CL	0	1,89	0,75	1,32	0,57
	1	4,47	1,15	2,81	1,66
	2	2,69	0,07	1,38	1,31
CL	Tot	3,05	0,19	1,62	1,43
FC		31,86	3,06	17,46	14,40
LC		12,71	2,54	7,62	5,09

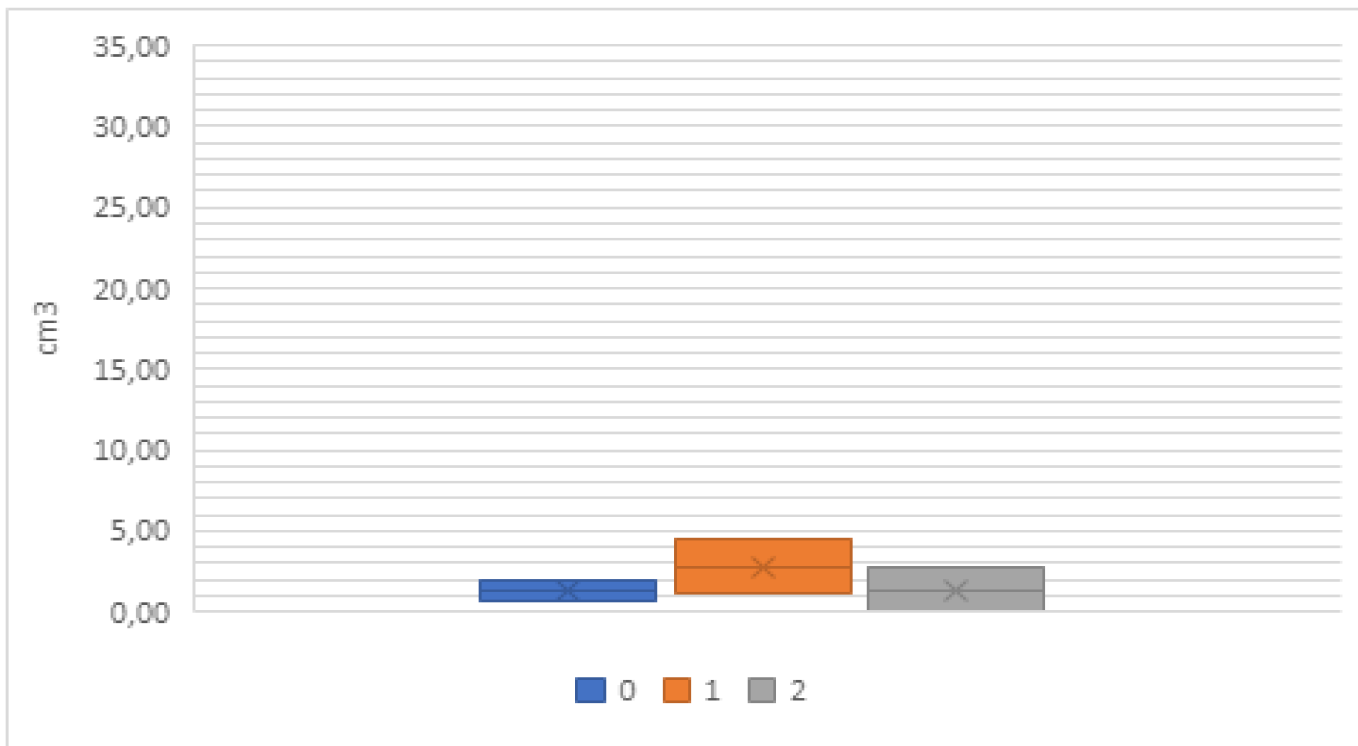


Grafico 3.1: Confronto grafico del volume di corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0).

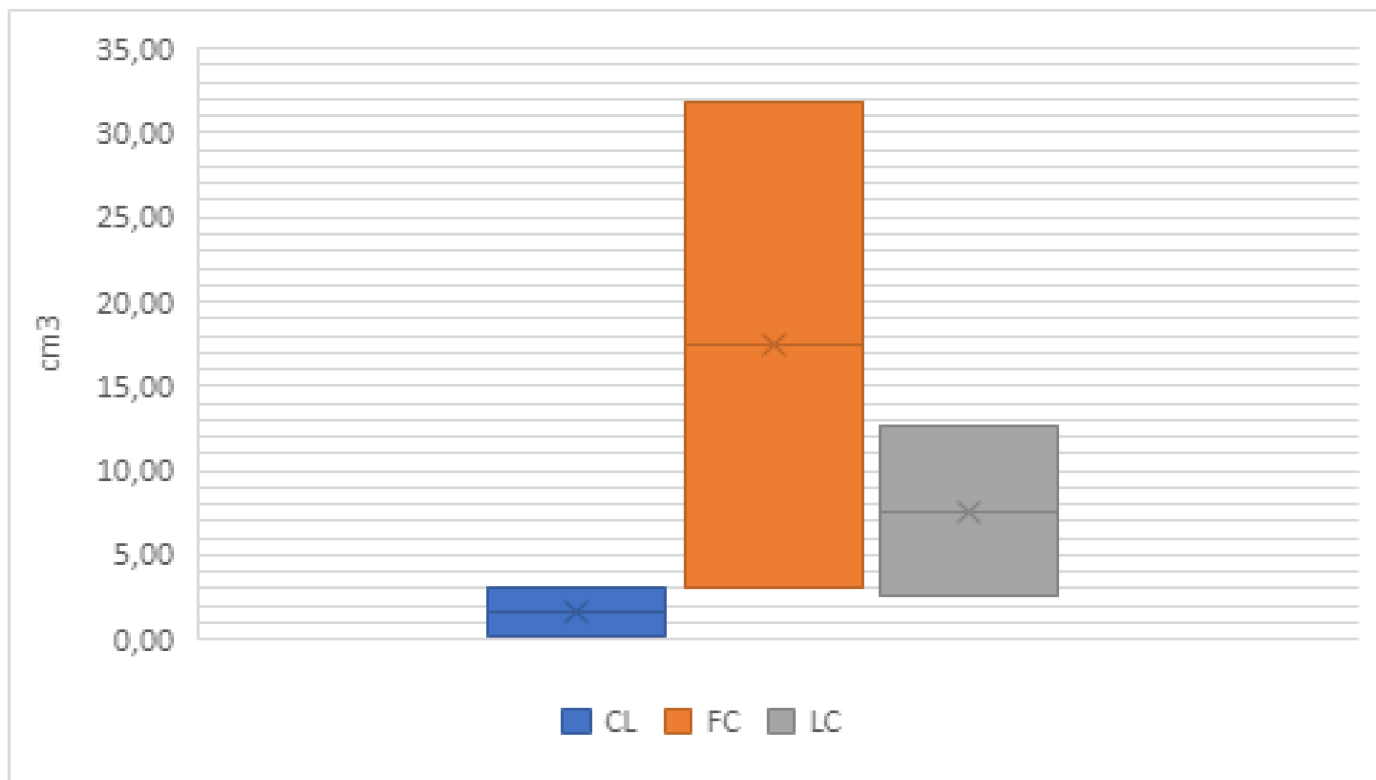


Grafico 3.2: Confronto grafico del volume tra corpi lutei (CL), cisti follicolari (FC), e cisti luteali (LC).

Tabella 4: Conta dei pixels (n) di: corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0), totale dei corpi lutei (CL Tot), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

Struttura	Gravidanza	Massimo	Minimo	Media	Dev. st.
CL	0	7752,40	3883,60	5818,00	1934,40
	1	21961,98	8513,36	15237,67	6724,31
	2	13525,83	3452,99	8489,41	5036,42
CL	Tot	15271,18	3632,59	9451,88	5819,29
FC		57031,97	17500,70	37266,33	19765,63
LC		45119,16	14233,70	29676,43	15442,73

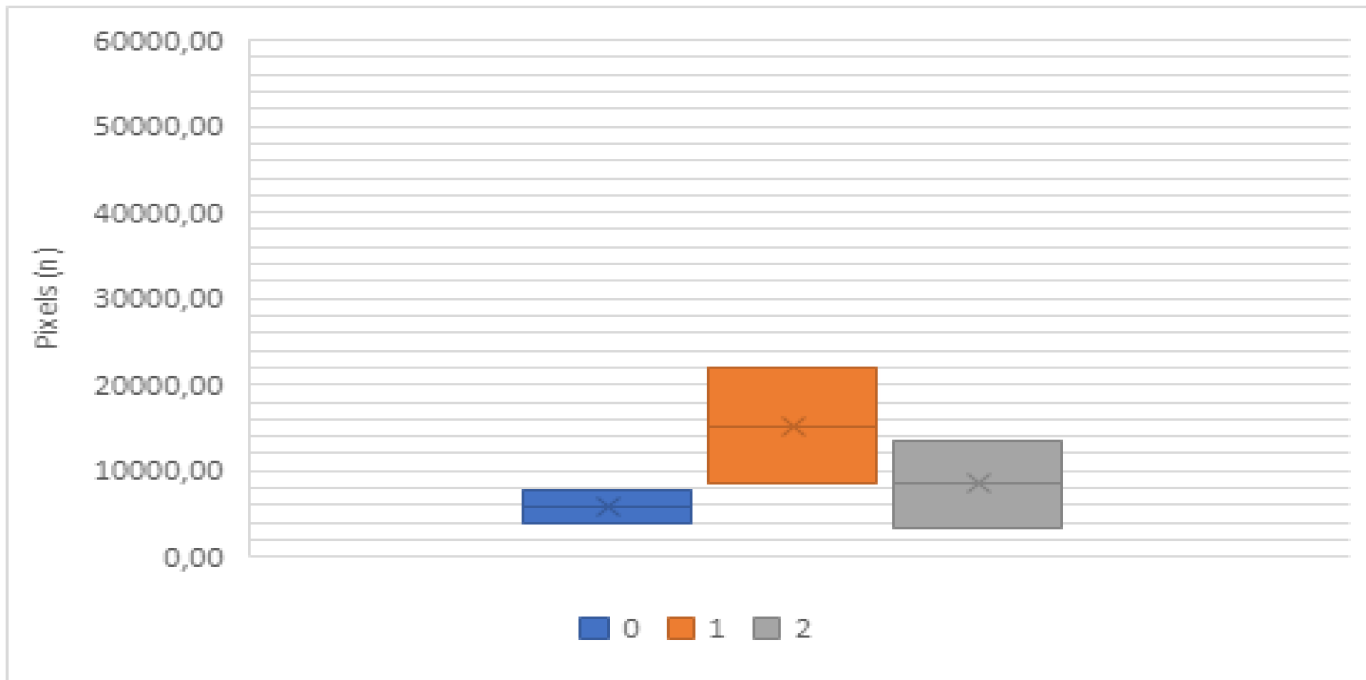


Grafico4.1: Confronto grafico della conta dei pixels tra corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), e corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0).

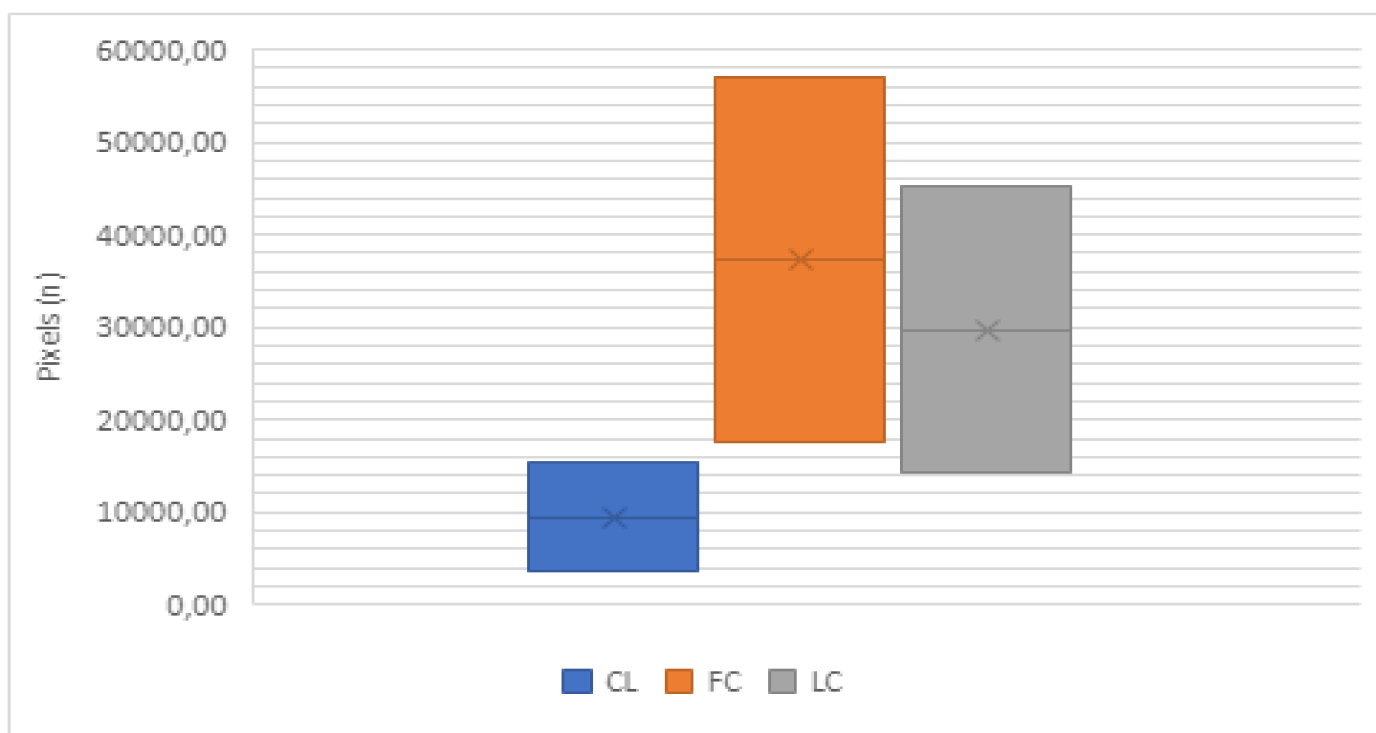


Grafico 4.2: Confronto grafico della conta dei pixels tra corpi lutei (CL), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

Tabella 5: Dati di intensità media dei pixels espressa tramite scala dei grigi da 0 a 255 di: corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0), totale dei corpi lutei (CL Tot), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

Struttura	Gravidanza	Massimo	Minimo	Media	Dev. st.
CL	0	163,28	130,45	146,87	16,42
	1	153,48	126,43	139,96	13,52
	2	150,47	123,14	136,81	13,67
CL	Tot	151,97	124,28	138,13	13,84
FC		84,83	43,49	64,16	20,67
LC		118,61	62,64	90,63	27,98

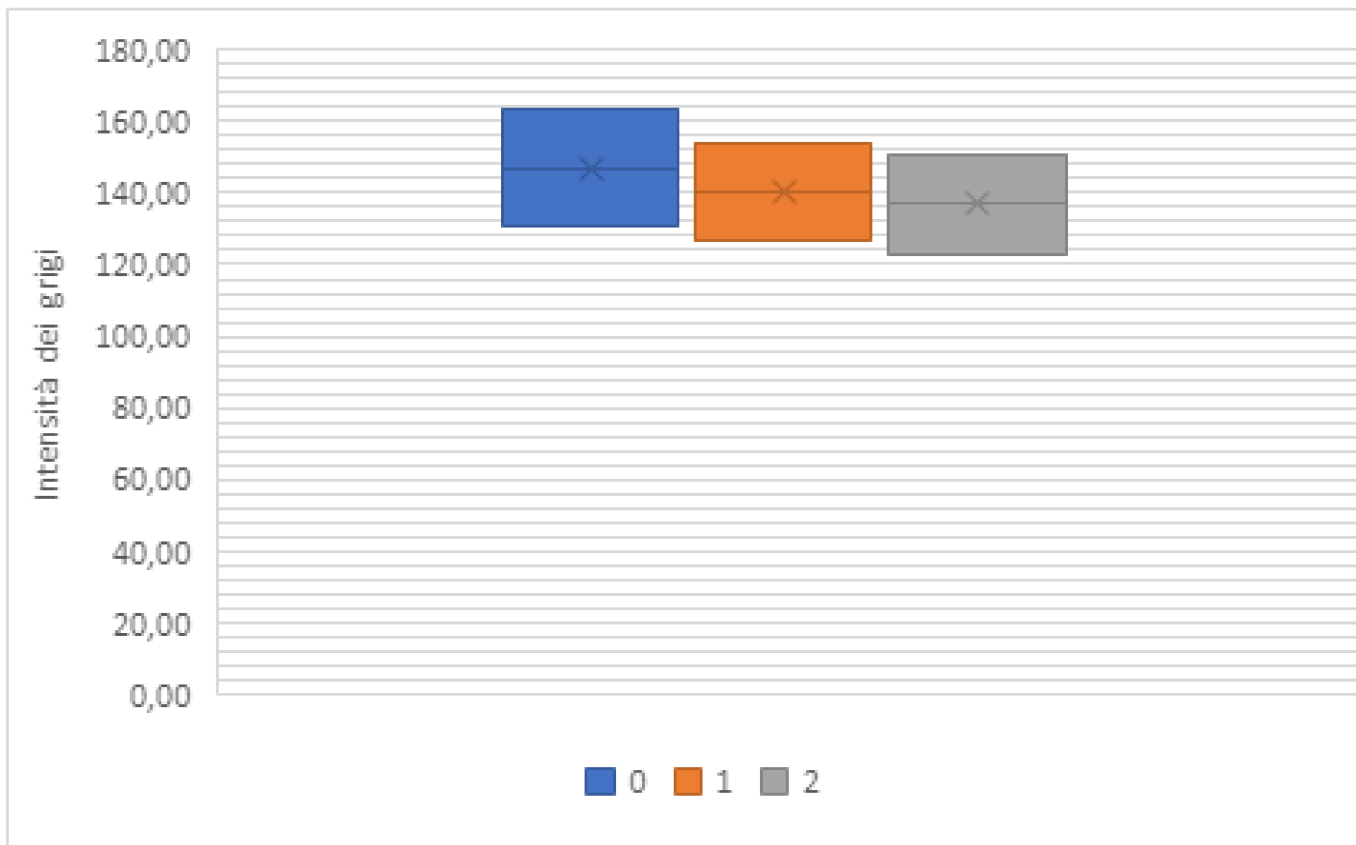


Grafico 5.1: Confronto grafico dell'intensità media dei pixels di corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0).

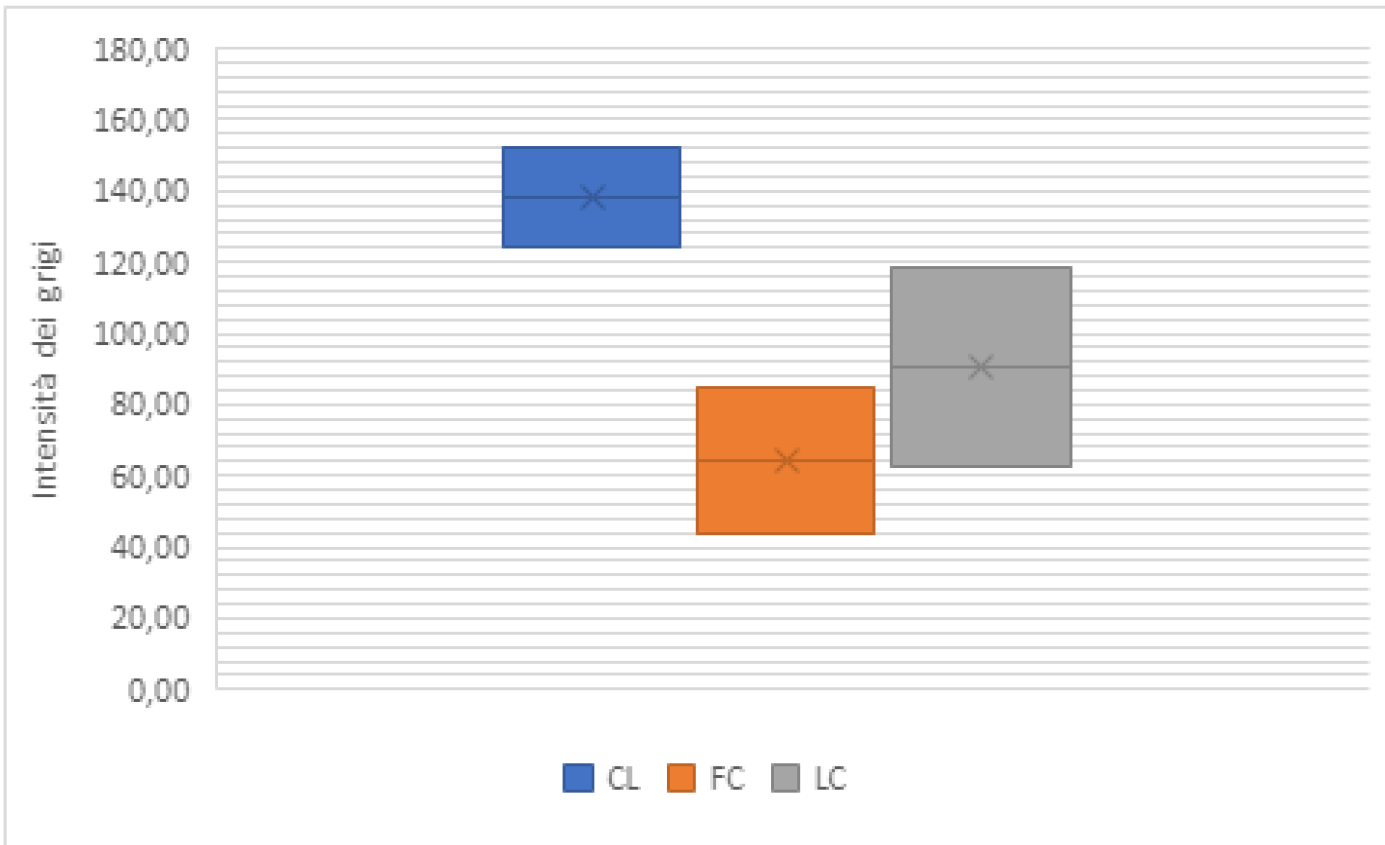


Grafico 5.2: Confronto grafico dell'intensità media dei pixels tra corpi lutei (CL), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

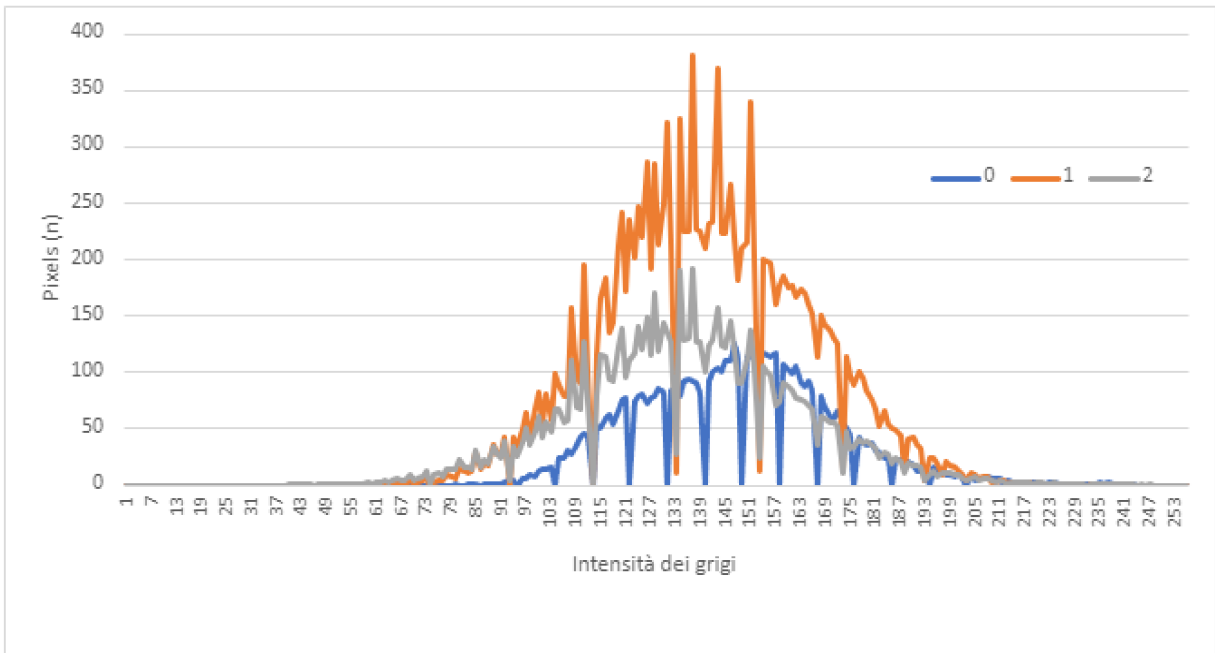


Grafico 6: Confronto tra gli istogrammi di intensità dei pixels di corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2), e corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0).

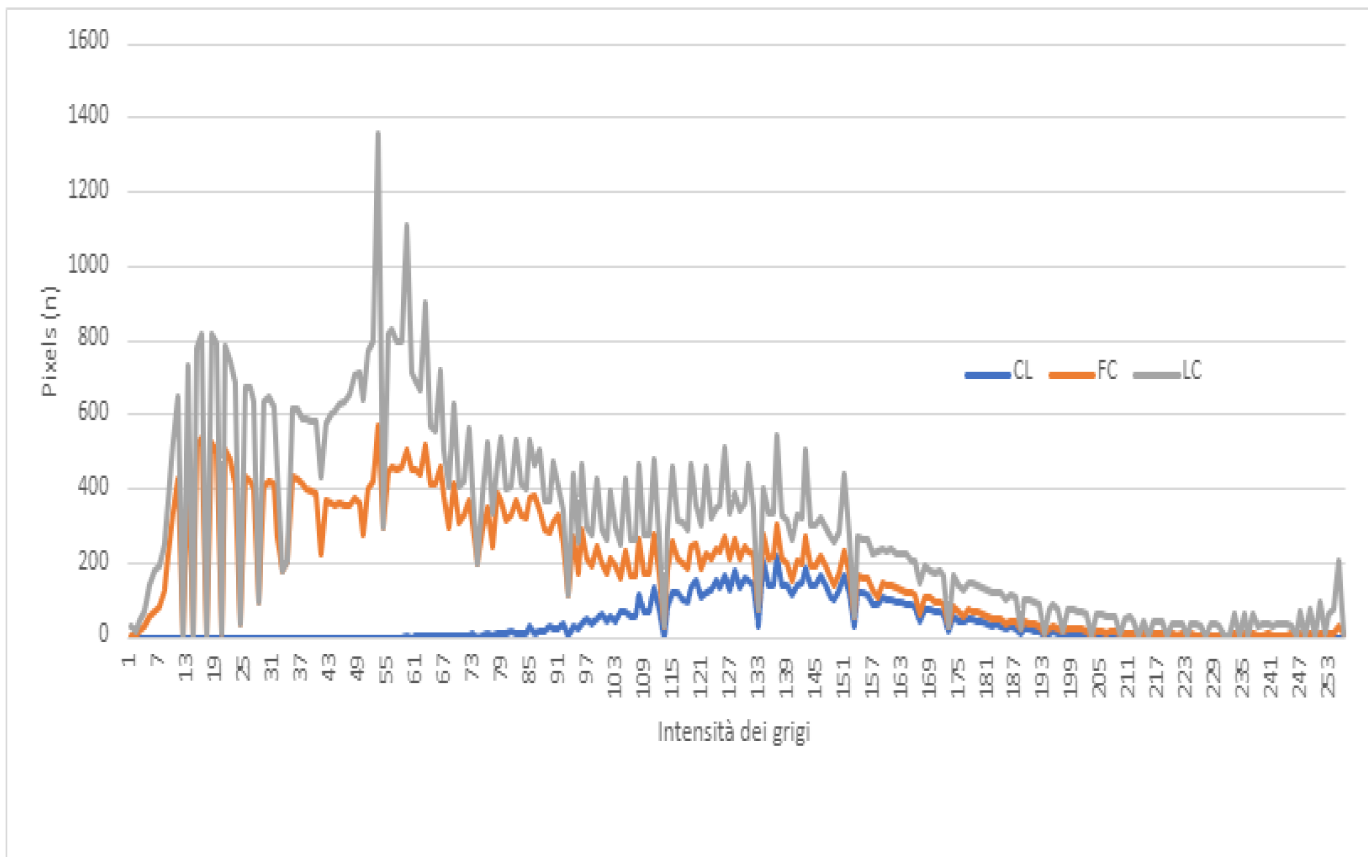


Grafico 7: Confronto tra gli istogrammi di intensità dei pixels di corpi lutei (CL), cisti follicolari (FC) e cisti luteiniche (LC).



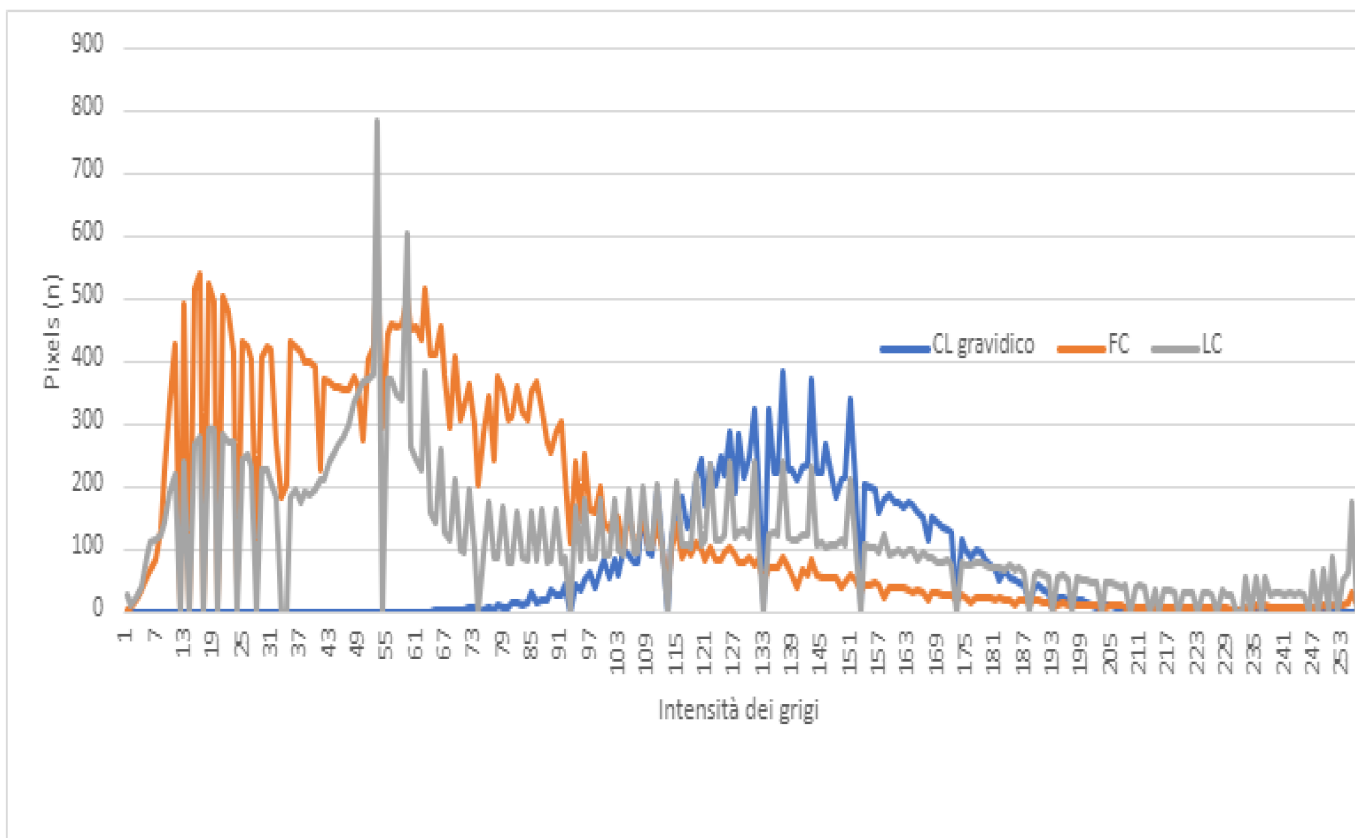


Grafico 8: Confronto tra gli istogrammi di intensità dei pixels di corpi lutei gravidici (CL gravidico), cisti follicolari (FC) e cisti luteali (LC).

## 4. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti in merito alla misura degli assi e del volume dei corpi lutei, pur presentando una certa variabilità, non hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le tre categorie di corpi lutei: corpi lutei gravidici (1), corpi lutei non gravidici (2) e corpi lutei con dato di gravidanza mancante (0). (Grafico 1.1, Grafico 2.1, Grafico 3.1). Sulla base di questo risultato, le dimensioni del corpo luteo sembrano quindi non essere connesse alla presenza o meno di una gravidanza. Uno studio su bufale mediterranee italiane però, ha evidenziato come le dimensioni del corpo luteo possono essere utilizzate come indicatore di una possibile gravidanza se si considera l'aumento di diametro e dell'area del corpo luteo da 5 a 10d post inseminazione, cosa che non si verifica nelle bufale non gravide. Inoltre, un'altra variazione dell'area del corpo luteo si può rilevare

anche tra 15-20d post inseminazione, con aumento delle dimensioni nelle bufale gravide, mentre gli animali non gravidi presentano una riduzione delle dimensioni del corpo luteo (Vecchio et al. 2012).

Inoltre, in merito alla determinazione del volume del corpo luteo utilizzando la formula dell'ellissoide, uno studio nella specie bovina ha applicato lo stesso calcolo per confrontare il volume di corpi lutei omogenei e cavitari, e il loro volume di tessuto luteale (Grygar I. et al. 1997). Utilizzando i risultati di tale studio per un confronto tra bufale e bovine in merito al volume di corpi lutei gravidici e non gravidici si evidenzia rispettivamente un volume di  $2,81 \pm 1,66 \text{ cm}^3$  e  $1,38 \pm 1,31 \text{ cm}^3$  per le bufale e un volume di  $6,05 \pm 1,71 \text{ cm}^3$  e  $7,52 \pm 3,14 \text{ cm}^3$  per le bovine, confermando il fatto che le dimensioni dei corpi lutei nelle bufale sono più piccole rispetto a quelle della specie bovina.

I risultati ottenuti in merito alla conta dei pixels confrontando corpi lutei gravidici e non (Grafico 4.1), nonostante una certa variabilità tra i due, non ha evidenziato differenze statisticamente significative, il che è riconducibile al risultato ottenuto dal confronto del volume (Grafico 3.1), dove i corpi lutei gravidici sono risultati tendenzialmente più grandi rispetto a quelli non gravidici, cosa che spiega la maggiore conta dei pixels per i corpi lutei gravidici.

Per quanto riguarda l'ecotessitura del corpo luteo, uno studio sulle bovine ha mostrato come questa tenda a variare in funzione dello stadio fisiologico del corpo luteo. L'intensità media dei pixels del corpo luteo risulta elevata durante il metaestro (3d post-estro), bassa durante la fase iniziale e intermedia di diestro, e presenta un nuovo aumento durante la fase di proestro. (J.W. Tom et al. 1997). In questo studio per l'analisi dell'intensità media dei pixels non è stata considerata la fase del ciclo estrale per i corpi lutei non gravidici, che sono stati raggruppati in un'unica categoria.

Dal confronto dell'intensità media dei pixels tra corpi lutei gravidici e non, non sono emerse differenze rilevanti dal punto di vista statistico (Grafico 5.1), suggerendo che l'intensità media dei pixels del corpo luteo non è un parametro sufficiente per una diagnosi di gravidanza, il che necessita quindi il monitoraggio di altri parametri del corpo luteo per poter effettuare la diagnosi.

In merito all'utilizzo del corpo luteo come indicatore di diagnosi di gravidanza uno studio ha rilevato che le bufale che evidenziano un maggiore sviluppo nelle dimensioni e nella vascolarizzazione del corpo luteo, e più alti livelli di progesterone tra il quinto e il decimo giorno post-inseminazione presentano un più alto tasso di gravidanza (Neglia G. et al. 2015).

In aggiunta, uno studio eseguito su delle bufale egiziane ha mostrato come la valutazione del flusso sanguigno del corpo luteo con l'uso dell'eco-doppler possa essere utilizzata per una diagnosi di gravidanza precoce dal diciassettesimo giorno post-inseminazione con una accuratezza dell'80,4% e dal ventunesimo giorno con un'accuratezza del 96,4% (Haney Samir and Mohammed M.M. Kandiel 2019).

Dalla comparazione tra gli istogrammi di intensità dei pixels dei corpi lutei gravidici e non (Grafico 6) si può notare che il range di intensità lungo la scala dei grigi da 0 a 255 non presenta particolari differenze come già evidenziato mediante il confronto grafico dell'intensità media dei pixels (Grafico5.1). Le differenze invece, relative all'altezza delle curve sono dovute alla conta dei pixels, ma come già detto precedentemente pur essendovi una certa variabilità tra i corpi lutei gravidici e non, questa non risulta essere statisticamente significativa.

Per quanto riguarda il confronto delle dimensioni tra corpi lutei e cisti, in merito alla lunghezza dell'asse maggiore, dal confronto grafico (Grafico1.2) sono state evidenziate differenze statisticamente significative solo tra i corpi lutei e le cisti follicolare. Al contrario, dal confronto grafico della lunghezza dell'asse minore (Grafico 2.2) sono emerse differenze statisticamente significative sia tra i corpi lutei e le cisti follicolari, sia tra corpi lutei e cisti luteiniche. In entrambi i confronti grafici non sono emerse differenze tra le dimensioni delle cisti.

Infine, nel confronto grafico del volume (Grafico 3.2) sono anche qui risultate differenze statisticamente significative tra corpi lutei e cisti, mentre dal confronto del volume di cisti follicolari e luteali non sono emerse diversità, ma esaminando il grafico è possibile osservare come le cisti follicolari presentino un'elevata variabilità in termini di volume rispetto a quelle luteali.

I risultati ottenuti dal confronto delle dimensioni delle cisti coi corpi lutei confermano il fatto che uno dei maggiori parametri utilizzabili per la distinzione

delle cisti dalle altre strutture ovariche risulta essere la dimensione, rilevabile tramite palpazione o ecografia.

Dal confronto grafico della conta dei pixels tra corpi lutei e cisti (Grafico4.2) sono risultate differenze significative tra i corpi lutei e le cisti, ma non tra cisti follicolari e luteali. Questo risultato è a sua volta riconducibile ai dati relativi al volume in quanto la conta dei pixels è data dal numero di pixels che costituiscono l'area, per cui le dimensioni elevate delle cisti determinano l'elevata conta di pixels.

Il confronto grafico dell'intensità media dei pixels tra corpi lutei e cisti (Grafico5.2) ha nuovamente evidenziato differenze significative tra le due strutture. In questo caso l'intensità media delle cisti risultava più bassa rispetto a quella del corpo luteo. Tale differenza è riconducibile al fatto che le cisti presentano un accumulo di liquido al loro interno, il quale risulta anecogeno (nero) all'ecografia e di conseguenza questo porta ad un abbassamento della media di intensità calcolata secondo la scala dei grigi da 0 (nero) a 255 (bianco). Da questo grafico è anche possibile notare come le cisti luteali presentino una maggiore intensità media dei pixels rispetto alle cisti follicolari, pur non essendo statisticamente rilevante. Questa diversità risiede nel fatto che la cisti luteale presenta una parete più spessa e ecogenica (parete luteinizzata) rispetto a quella delle cisti follicolari.

Per quanto riguarda il confronto degli istogrammi di intensità dei pixels tra corpi lutei e cisti (Grafico 7, Grafico 8) è possibile notare come il range di intensità entro cui variano le cisti risulti molto più ampio rispetto a quello del corpo luteo. Questo aspetto è dovuto alla diversa ecogenicità che caratterizza le cisti in quanto presentano fluido anecogeno, il quale rientra nei valori più bassi della scala di intensità (nero =0), mentre la parete delle cisti è ecogenica e presenta una maggiore intensità per cui si posiziona nella parte centrale della scala dei grigi. Questa situazione fa sì che graficamente l'istogramma di intensità dei pixels delle cisti sia distribuito lungo la parte iniziale e centrale della scala dei grigi. L'ampio intervallo di variazione dell'intensità dei pixels nelle cisti determina quindi una intensità media più bassa dei corpi lutei come osservato nel grafico 5.2.

L'altezza delle curve nel grafico 7 e 8 è invece dovuta alla conta dei pixels, che, come visto, precedentemente risulta essere più elevata nelle cisti per via delle elevate dimensioni rispetto ai corpi lutei.

Un appunto da fare in merito ai grafici di confronto tra gli istogrammi di intensità (Grafico 6, Grafico 7, Grafico 8) riguarda la presenza di “spike” lungo la curva. Questi, si ipotizza essere dovuti a valori della scala dei grigi che sono scarsamente o maggiormente rappresentati nelle immagini ecografiche analizzate, determinando un picco vero l'alto o verso il basso nella curva che descrive la media degli istogrammi di intensità.

## 5. CONCLUSIONI

In conclusione, in merito al confronto tra corpi lutei gravidici e non, non sono state evidenziate differenze statisticamente significative che suggeriscano l'utilizzo delle dimensioni o dell'ecotessitura del corpo luteo per una diagnosi di gravidanza. Al contrario dal confronto tra corpi lutei e cisti è emerso come queste due strutture differiscano sia per dimensione che per ecogenicità.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- Alim M.A., Jahangir A., Faruque M.D. (2014). A review-reproductive biotechnology used in buffalo production. *International Journal of Sciences and Applied Research*, 13-22
- A.N.A.S.B. <https://www.anasb.it/statistiche>
- A.N.A.S.B. <https://www.anasb.it/bufala-mediterranea-italiana/specie-bufalina>
- Antonio Borghese (2005). Buffalo production and research, REU Technical Series,1-321
- A. Gaviraghi, R. Puglisi, D. Balduzzi, A. Severgnini, V. Bornaghi, G. Bongioni, A. Frana, L.M. Gandini, A. Lukaj, C. Bonacina, A. Galli (2013). Minimum number of spermatozoa per dose in Mediterranean Italian buffalo using sexed frozen semen and conventional artificial insemination. *Theriogenology* 79, 1171-1176.
- Baruselli P.S., R.G. Mucciolo, J.A. Visintin, W.G. Viana, R.P. Arruda, E.H. Madureira, C.A. Oliveira, J.R. Molero-Filho (1977), Ovarian follicular dynamics durin the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*), *Theriogenology* 47, 1531-1547
- Baruselli P.S., E.H. Madureira, J.A. Visintin, R. Porto-Filho, N.A.T. Carvalho, G. Campanile and L. Zicarelli (2000). Failure of oocyte entry into oviduct in superovulated buffalo. *Theriogenology* Vol. 53, 491.
- Baruselli P.S., N. A: T. Carvalho, L.U: Gimenes, G. A. Crepaldi (2010). Fixed-time artificial insemination in buffalo. *Italian Journal of Animal Science*, 107-118.
- Baruselli P.S. Júlia Gleyci Soares de Carvalho, Flavia Morag Elliff , Júlio Cesar Barboza da Silva, Damiana Chello, Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho (2020). Embryo transfer in buffalo.

- BMAO Perera, de Silva LNA, (1985) .Gestation length in indigenous (Lanka) and exotic (Murrah) buffaloes in Sri Lanka. Buffalo J 1, 83–87.
- B.M.A.O. Perera (1999) Reproduction in water buffalo: comparative aspects and implications for management, Journal of Reproduction and Fertility Supplement 54, 157-168
- BMAO Perera (2008). Reproduction in Domestic Buffalo, Reprod Dom Anim 43 (Suppl.2), 200-206
- B.M.A.O. Perera (2011). Reproductive cycles of buffalo. Animal Reproduction Science 124, 194-199
- BM Manjunatha, JP Ravindra, PSP Gupta, M Devaraj and S Nandi (2008). Oocyte Recover by Ovum Pick Up and Embryo Production in River Buffalo (*Bubalus bubalis*). Reprod Dom Anim 43, 477-480.
- B.M. Manjunatha, P.S.P. Gupta, J.P. Ravindra, M. Devaraj, S. Nandi (2009). Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. The Veterinary Journal 179, 287-291.
- Canu G. (2016) L'allevamento bufalino moderno. Agraria.org: 1-3
- DesCôteaux Luc, Giovanni Gnemmi, Jill Colloton (2009). Ultrasonography of the Bovine Female Genital Tract. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice Vol. 25, 733-752.
- Edwin Curading Atabay, Eufrocina dela Pena Atabay, Excel Rio Santos Maylem, Erwin dela Cruz Encarnacion and Ronaldo Lastimosa Salazar (2020). Enhancing prostaglandin-based estrus synchronization protocol for artificial insemination in water buffaloes. Buffalo Bulletin Vol. 39 No.1, 53-60.
- F. De Rensis, F. Lo'pez-Gatius (2007). Protocols fro synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalu bubais*): a review. Theriogenology 67, 209-216.

- Galli, A., Bornaghi, V., Balduzzi, D., Buttazzoni, L., Aleandri, R., (1993). Sexual behaviour and semen quality relating to Italian buffalo. Proc. 3rd World Buffalo Congr., Varna, Bulgaria vol. 1, 562–570
- Galli, R. Duchi, G. Lazzar, I. Lagutina, S. Colleoni, P. Turini, G. Crotti, J. Angel and J. Berdugo (2011). 157 Pregnancies and calves after transfer of in-vitro-produced river buffalo embryos after cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development* 24
- Garverick H. Allen (1997). Ovarian Follicular Cysts in Dairy Cows. *J Dairy Science*, 995-1004.
- Gasparri B. (2002). In vitro embryo production in buffalo species: State of the ART. *Theriogenology* 57, 237-256.
- Gasparri B., Anna De Rosa, Laura Attanasio, Lucia Boccia, Rossella Di Palo, Giuseppe Campanile, Luigi Zicarelli (2008). Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Animal Reproductive Science* 105, 354-364.
- GA Presicce (2007), Reproduction in the water buffalo, *Repro Dom Anim* 42 (Suppl.2), 24-32.
- GN Purohit, Pankaj Thanvi, Munesh Pushp, Mitesh Gaur, Chandra Shekher Saraswat, Atul Shanker Arora, Surya Prakash Pannu and Trilok Gocher (2019). Estrus synchronization in buffaloes: Prospects, approaches and limitations. *The Pharma Innovation Journal* , 54-62.
- Giuseppe Campanile, Gianluca Neglia, Bianca Gasparri, Giorgio Galiero, Alberto Prandi, Rossella Di Palo, Michael J. D'Occhio, Luigi Zicarelli (2005). Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in the reproductive function. *Theriogenology* 63, 2334-2340.
- G. Campanile, R. Di Palo, G. Neglia, D. Vecchio, B. Gasparri, A. Prandi, G. Galiero, M.J. D'Occhio (2007). Corpus luteum function and embryonic mortality in buffaloes treated with a GnRH agonist, hCG and progesterone. *Theriogenology* 67, 1393-1398



- G. Campanile, Pietro Sampaio Baruselli , Gianluca Negliaa, Domenico Vecchioa, Bianca Gasparrini , Lindsay U. Gimenes , Luigi Zicarelli , Michael J. D'Occhio (2010). Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Animal Reproduction Science* 121, 1-11.
- G. Campanile, G. Neglia (2010) Embryonic mortality in buffalo cows. *Italian Journal of Animal Science* , 119-129.
- G. Campanile, B. Gasparrini, D. Vecchio , G. Neglia, E.M. Senatore, A. Bella, G.A. Presicce, L. Zicarelli (2011). Pregnancy rates following AI with sexed semen in Mediterranean Italian buffalo heifers. *Theriogenology* 76, 500-506
- GK Das and FA Khan (2010). Summer Anoestrus in Buffalo- A review. *Reprod Dom Anim* 45, e483-e494
- Ghosh Jyotirmoy, Mondal Sukanta (2006). Nucleic acids and protein content in relation to growth and regression of buffalo corpora lutea. *Animal Reproduction Science* 93, 316-321
- G. N. Purohit, G. P. Duggal, D. Dadarwal, Dinesh Kumar, R. C. Yadav and S. Vyas (2003). Reproductive Biotechnologies for improvement of Buffalo: The Current Status. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol 16. No.7, 1071-1086
- Grygar I.,a, E. Kudlác, R. Dolezel. J. Nedbiàlková (1997). Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. *Animal Reproduction Science* 49, 77-82.
- G. Sansone, M.J.F. Nastri, A. Fabbrocini (2000). Storage of buffalo semen. *Animal Reproduction Science* 62, 55-76.
- Haney Samira, Mohamed M.M. Kandiel (2019). Accuracy of subjective evaluation of luteal blood flow by color Doppler ultrasonography for early diagnosis of pregnancy in Egyptian buffalo.

- Hufana-Durana Danilda, Prudencio B. Pedroa , Hernando V. Venturina, Rogelio D. Hufana, Apolinario L. Salazar, Peregrino G. Duran, Libertado C. Cruz (2004). Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of in vitro-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. *Theriogenology* 61, 1429-1439.
- [imageJ.nih.gov](https://imagej.nih.gov). Introduction
- Inderjeet Singh, A.K. Balhara (2016). New approaches in buffalo artificial insemination programs with special reference to India. *Theriogenology* 86, 194-199.
- J.W. Tom, R. A: Pierson and G.P. Adams (1997). Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. *Theriogenology* 49, 1345-1352.
- J. Singh, A.S. Nanda, G.P. Adams (2000). The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Animal Reproduction Science* 60-61, 593-604
- Kanokwan Srirattana, Danilda Hufana-Duran, Eufrocina P. Atabay, Peregrino G. Duran, Edwin C. Atabay, Kehuan Lu, Yuanyuan Liang, Thuchadaporn Chaikhun-Marcou, Kasem Theerakittayakorn, Rangsun Parnpa (2022). Current status of assisted reproductive technologies in buffaloes. *Animal Science Journal* , 1-26.
- A.M. King (2006). Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *The veterinary Journal* 171, 408-420.
- A. Kumaresan, M.R. Ansari, Abhishek Garg (2005). Modulation of post-thaw sperm functions with oviductal proteins in buffaloes. *Animal Reproduction Science*, 73-84.
- Lucarini S. (2021) Vi raccontiamo le razze: la Bufala Mediterranea Italiana. [www.ruminantia.it/vi-raccontiamo-le-razze-la-bufala-mediterranea-italiana](http://www.ruminantia.it/vi-raccontiamo-le-razze-la-bufala-mediterranea-italiana)
- Y.Q. Lu, X.W. Liang, M. Zhang, W.L. Wang, Y. Kitiyanant, S.S. Lu, B. Meng, K.H. Lu (2007). Birth of twins after in vitro fertilization with flow-

- cytometric sorted buffalo semen. *Animal Reproduction Science* 100, 192-196.
- L.F.C. Brito, R. Satrapa, E.P. Marson, J.P. Kastelic (2002). Efficacy of PGF2 a in water buffalo cows (*Bubalus bubalis*) is dependent upon plasma progesterone concentration, corpus luteum size and ovarian follicular status before treatment. *Animal Reproduction Science* 73, 23-35.
  - Mahak Singh, J.S. Rajoriya, Anuj Kumar, S.K. Ghosh and J.K. Prasad (2018). Cryopreservation of buffalo semen: current status and future prospective. *Buffalo Bulletin* Vol. 37 No.2.
  - M. Drost (2007). Bubaline versus bovine reproduction. *Theriogenology* 68, 447-449
  - Michael J. D'Occhio a , Sarvpreet S. Ghuman , Gianluca Neglia, Giovanni della Valle, Pietro S. Baruselli , Luigi Zicarelli , Jose A. Visintin , Mihir Sarkar , Giuseppe Campanile (2020). Exogenous and endogenous factors in seasonality of reproduction in buffalo: A review. *Theriogenology* 150, 186-192.
  - M.R. Jainudeen e E.S.E. Hafez, *Cattle and Buffalo* 1993, Reproductive Cycles part III, 159-171
  - Misra A.K., R. Kasiraj, M. Mutha Rao J N.S. Rangareddy, R.S. Jaiswal and H.C. Pant (1998). Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 637-649.
  - N.A.T. Carvalho, J.G. Soares, R.M. Porto Filho, L.U. Gimenes, D.C. Souza, M. Nichi , J.S. Sales, P.S. Baruselli (2013). Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a timed artificial insemination protocol in buffalo during the nonbreeding season . *Theriogenology* 79, 423-428.
  - Neglia G., Bianca Gasparri, Viviana Caracciolo di Brienza, Rossella di Palo, Giuseppe Campanile, Giorgio Antonio Presicce, Luigi Zicarelli (2003). Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes

derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. *Theriogenology* 59, 1123-1130.

- Neglia G., Bianca Gasparri, Rosella Di Palo, Clemente De Rosa, Luigi Zicarelli, Giuseppe Campanile (2003). Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology* 60, 125-133.
- Neglia G., Bianca Gasparri, Domenico Vecchio, Lucia Boccia, Ettore Varricchio, Rossella Di Palo, Luigi Zicarelli Giuseppe Campanile (2011). Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. *Animal Reproduction Science*, 180-186.
- Neglia G., Brunella Restucci, Marco Russo, Domenico Vecchio, Bianca Gasparri, Alberto Prandi, Rossella Di Palo, Michael J. D'Occhio, Giuseppe Campanile (2015). Early development and function of the corpus luteum and relationship to pregnancy in the buffalo. *Theriogenology* 83, 959,967.
- Neglia G., Bianca Gasparri, Angela Salzano, Domenico Vecchio, Esterina De Carlo, Roberta Cimmino, Anna Balestrieri, Michael J. D'Occhio, Giuseppe Campanile (2016). Relationship between the ovarian follicular response at the start of an Ovsynch-TAI program and pregnancy outcome in the Mediterranean river buffalo.
- Neglia G. Massimo Capuano, Anna Balestrieri, Roberta Cimmino, Francesco Iannaccone, Francesco Palumbo, Giorgio A. Presicce, Giuseppe Campanile (2018). Effect of consecutive re-synchronization protocols on pregnancy rate in buffalo (*Bubalus bubalis*) heifers out of the breeding season. *Theriogenology* 113, 120-126.
- Neglia G., Donato de Nicola, Luigi Esposito, Angela Salzano, Michael John D'Occhio, Gerardo Fatone (2020). Reproductive management in buffalo by artificial insemination, *Theriogenology* 150, 166-172.
- Neglia G. (2020). Fattori endogeni ed esogeni che influenzano la stagionalità riproduttiva nella specie bufalina. [www.ruminantia.it/fattori-](http://www.ruminantia.it/fattori-)

endogeni-ed-esogeni-cheinfluenzano-la-stagionalita-riproduttiva-nella-specie-bufalina

- Peter AT (2004). An Update on Cystic Ovarian Degeneration in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* Vol. 39 Iss.1, 1-7.
- Purohit G. N. (2014) Ovarian and oviductal pathologies in the buffalo: Occurrence, diagnosis and therapeutic approaches. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 156-168.
- Purohit G.N. *Bubaline Theriogenology*.
- R. Boni, S. Roviello, L. Zicarelli (1996). Repeated Ovum Pick-UP in Italian Mediterranean buffalo cows. *Theriogenology* 46, 899-909.
- Sakaguchi Kenichiro, Excel Rio S. Maylem, Ramesh C. Tilwani, Yojiro Yanagawa, Seiji Katagiri, Edwin C. Atabay, Eufrocina P. Atabay, Masashi Nagan (2019). Effect of follicle-stimulating hormone followed by gonadotropin-releasing hormone on embryo production by ovum pick-up and in vitro fertilization in the river buffalo. *Animal Science Journal* , 690-695.
- S. Akhter , B.A. Rakha, M.S. Ansari, A.U. Husna, S. Iqbal, M. Khalid (2017). Evaluation of quail and turkey egg yolk for cryopreservation of Nili-Ravi buffalo bull semen. *Theriogenology* 87, 259-265.
- Suresh K. P., S. Nandi, S. Mondal (2009). Factors affecting laboratory production of buffalo embryos: A meta-analysis. *Theriogenology* 72, 978-985.
- Suthar, V.S. And Dahmi, A.J. (2010). Estrus detection Methods in Buffalo, *Veterinary World* Vol.3, 94-96
- Terzano Maria Giuseppina (2012). Ultrasonography and Reproduction in Buffalo. *Journal of Buffalo Science*, 163-173.
- Usmani, R.H., Dailey, R.A., Inskeep, E.K. (1990). Effects of limited suckling and varying prepartum nutrition on postpartum reproductive traits of milked buffaloes. *J. Dairy Sci.* 73, 1564–1570

- Y. Zhang, L. Colli and J. S. F. Barker, Asian water buffalo: domestication, history and genetics (2020), *Animal genetics*, 177-191.
- Zambrano-Vàron J. (2015). Reproductive application of ultrasound in the female buffalo (*Bubalus bubalis*). *Bubaline Theriogenology*.
- Zicarelli L (2021) La storia della Bufala Mediterranea Italiana e della sua mozzarella raccontata dal Prof. Zicarelli. [www.ruminantia.it/la-storia-della-bufala-mediterraneaitaliana-e-della-sua-mozzarella-raccontata-dal-prof-zica](http://www.ruminantia.it/la-storia-della-bufala-mediterraneaitaliana-e-della-sua-mozzarella-raccontata-dal-prof-zica)