



Università degli Studi di Padova
Facoltà di Medicina Veterinaria
Corso di Laurea in Medicina Veterinaria

TESI DI LAUREA

**APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE
DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE IN ALPACA (*VICUGNA
PACOS*)**

Relatore: Dott. Calogero Stelletta

Correlatore: Dott. ssa Nasrin Sultana Juyena

Laureando: Yuri Bellicanta

N° Matricola: 521091/MV

Anno Accademico 2009/2010

ABSTRACT

Species-specific protocols for breeding soundness in the alpaca male are not yet well defined. The aim of the work was to study the relationship between the level of answer to the GnRH test (1st blood sample for testosterone - administration of GnRH analogue - 2nd blood sample for testosterone 60 mins after the GnRH administration) in terms of delta - testosterone and quality of ejaculate. A series of trials were carried out with 5 adult alpaca males (4 huacaya and 1 suri), considering the presence of the female teaser (T1 - Female isolation; T2 - Female presence without mounts; T3 - Female presence with mounts), evaluating the answer to the GnRH test and monitoring the scrotal surface temperature through the use of thermography during the test times. Subsequently, the variation of testosterone every 10 mins during the GnRH test and the testicular arterial fluximetry using pulsed echo-color Doppler were considered. During all the trials, the semen quality was evaluated by defining viscosity, concentration, motility and morphology parameters. The female teaser presence with mounts determined a significant decrease in the basal level of testosterone but with the higher delta-testosterone during the GnRH-test. The scrotal surface temperature showed a drop during the first quarter of the GnRH-test time followed by an increase related to the level of testosterone. The maintenance of an adequate answer to the GnRH test and high level of thermoregulation results to be related to a good semen quality.

INDICE

Premessa	1
CAPITOLO I - Introduzione	3
1.1 Funzionalità testicolare.....	3
1.1.1 Fisiologia testicolare.....	3
1.1.2 Fattori intratesticolari di controllo della funzionalità testicolare.....	6
1.2 Anatomia dei testicoli dei camelidi.....	12
1.3 Test funzionali.....	15
1.4 Tecnica termografica.....	16
1.4.1 La termografia.....	16
1.4.2 La termocamera.....	17
1.4.3 Esecuzione di una termografia.....	18
1.4.4 Applicazioni della termografia in medicina.....	19
1.5 Tecnica ecografica.....	20
1.5.1 Principi basilari dell'ecografia.....	20
1.5.2 Basi fisiche del Doppler.....	22
1.5.3 Doppler pulsato, doppler continuo, color doppler.....	23
CAPITOLO II - Materiali e metodi	25
2.1 Gli alpaca.....	25
2.2 Test del GnRH.....	25
2.3 Termografia.....	25
2.3.1 La termocamera (caratteristiche tecniche).....	25
2.3.2 Rilievi termografici.....	26
2.4 Ecografia.....	28
2.4.1 L'ecografo.....	28
2.4.2 Flussimetria.....	28
2.4.3 Intensità ecografica testicolare.....	30
2.5 Qualità seminale e dimensioni testicolari.....	30
2.6 Procedure di laboratorio.....	32

2.7 Analisi statistica.....	32
CAPITOLO III - Risultati.....	34
CAPITOLO IV - Discussione e Conclusione.....	60
4.1 Discussione.....	60
4.2 Conclusione.....	62
BIBLIOGRAFIA.....	64

Premessa

Con il presente lavoro si vuole dimostrare l'applicabilità di un protocollo di valutazione della funzionalità testicolare innovativo nell'ambito della medicina veterinaria. Nonostante lo studio in questione sia stato effettuato su esemplari di alpaca (*vicugna pacos*), appartenenti alla famiglia *Camelidae*, tale protocollo non deve essere inteso come esclusivo per questa specie animale, ma come un metodo che può trovare applicazione nelle altre specie di interesse veterinario, e non solo, visto l'utilizzo in medicina umana delle tecniche prese in considerazione in questo lavoro, in particolare dell'ecografia (Schurich et al. 2009, Dubinsky et al. 1998), per la diagnosi di patologie testicolari.

L'alpaca è una specie di interesse zootecnico la cui crescente importanza a livello mondiale, non solo dal punto di vista economico, ma anche medico, ne giustifica la scelta come oggetto di studio. Sono da tenere in considerazione anche le somiglianze anatomiche e fisiologiche con altri camelidi, anch'essi di importanza economica non indifferente in alcune regioni del mondo.

Inoltre, è possibile pensare ad una potenziale applicabilità del protocollo utilizzato nel presente studio all'interno di una breeding soundness evaluation di maschi di elevato valore riproduttivo.

Il punto centrale del protocollo presentato è rappresentato dalla stimolazione della funzionalità testicolare con il GnRH. L'innovazione del protocollo sta nella combinazione della tecnica termografica con quella ecografica, che hanno permesso di ottenere informazioni sulla termoregolazione, flussimetria e intensità ecografica testicolari, con la possibilità di confrontare queste con la testosteronemia ottenuta durante le diverse prove e con dati ottenuti precedentemente riguardanti la qualità seminale degli animali oggetto di studio. Esistono lavori precedenti sulla funzionalità testicolare che hanno preso in considerazione la tecnica termografica ed ecografica utilizzata in questo studio. In particolare, tali ricerche sono state effettuate sul toro (Gábor et al. 2001), sullo stallone (Bollwein et al. 2008, Zelli 2007) e sul cane (Günzel-Apel A-R et al. 2001). Le indagini iniziali effettuate con la termografia hanno suggerito il

successivo utilizzo dell'ecografia per complementare i dati con informazioni riguardanti il flusso sanguigno locale.

CAPITOLO I – Introduzione

1.1 Funzionalità testicolare

1.1.1 Fisiologia testicolare

Dal punto di vista funzionale, il testicolo viene suddiviso in tre compartimenti. Il compartimento del tessuto interstiziale, contenente le cellule del Leydig, circonda i tubuli seminiferi e li bagna con un liquido ricco di testosterone. Gli altri due compartimenti si trovano all'interno dei tubuli seminiferi. Il compartimento basale contiene gli spermatogoni, che si dividono per mitosi, mentre il compartimento luminale rappresenta un ambiente speciale dove gli spermatociti portano avanti le divisioni meiotiche per differenziarsi in spermatidi ed infine in spermatozoi. All'interno dei tubuli seminiferi, le cellule del Sertoli, che forniscono supporto e nutrimento alle cellule germinali in via di sviluppo, si estendono dal compartimento basale fino a quello luminale.

La termoregolazione dei testicoli è garantita dallo scroto, dal muscolo cremastere e dall'anatomia vascolare delle arterie e delle vene testicolari. Lo scroto è costituito da cute rinforzata da uno strato sottocutaneo e muscolare chiamato tunica dartos. La conformazione vascolare dell'arteria testicolare circondata dal plesso venoso testicolare (plesso pampiniforme) fornisce un meccanismo di scambio di calore controcorrente che risulta essenziale per la termoregolazione testicolare. La contrazione ed il rilassamento della tunica dartos e del muscolo cremastere si verificano sia in risposta a modificazioni della temperatura ambientale che ad altri stimoli tattili. Lo scroto di alcune specie, come il cavallo, contiene numerose ghiandole sudoripare e sebacee che contribuiscono ulteriormente al meccanismo della termoregolazione (Cunningham 2006).

Un aspetto importante della struttura testicolare è la presenza di barriere di trasporto selettive, che operano a tre diversi livelli. La prima è a livello dell'endotelio vascolare. La seconda sembra essere localizzata a livello delle cellule mioidi che circondano i tubuli seminiferi. La terza, e più importante, è la barriera costituita dalle tight-junctions tra le cellule del Sertoli, che

funzionalmente impedisce a molti composti presenti nel sangue e nel liquido interstiziale di raggiungere il compartimento luminale, permettendo così lo stabilirsi di un ambiente unico per lo sviluppo delle cellule germinali aploidi. La presenza di queste barriere selettive permette la creazione di microambienti unici non solo all'interno dei tubuli seminiferi, ma anche nello spazio interstiziale (Sharpe 1984).

Il sistema riproduttivo maschile è regolato da un complesso sistema di feedback che interessa l'ipotalamo, l'ipofisi anteriore e il testicolo. L'ipotalamo sintetizza e secreta l'ormone di liberazione delle gonadotropine (GnRH). Il GnRH, che viene secreto in maniera pulsatile, agisce direttamente sulle cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore. In risposta a questa stimolazione, le cellule ipofisarie sintetizzano e secernono l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH). Ogni cellula gonadotropa è in grado di sintetizzare e secernere sia l'FSH che l'LH. La pulsatilità è indispensabile per una regolare produzione gonadotropinica ma mentre la secrezione di LH è sensibile alla frequenza e all'ampiezza delle pulse di GnRH, che in condizioni fisiologiche sono determinate da un'azione di feedback negativo da parte del testosterone testicolare, la secrezione di FSH sembra essere relativamente insensibile (Turchi 2007). A livello testicolare, l'LH si lega ai recettori di membrana delle cellule del Leydig, stimolando la conversione del colesterolo in testosterone. Gli androgeni diffondono, quindi, nel sangue e nella linfa, dove si legano alle proteine leganti gli androgeni prodotte dalle cellule del Sertoli (Cunningham 2006).

La funzione delle cellule del Leydig declina con l'avanzare dell'età. I cambiamenti intracellulari relazionati all'età delle cellule del Leydig influenzano la risposta di queste cellule a fattori intratesticolari locali e al controllo ipofisario della loro attività secretoria. Il testosterone inibisce la secrezione di gonadotropine ipofisarie con un meccanismo di feedback negativo. L'inibina, prodotta dalle cellule del Sertoli, partecipa nel controllo della secrezione di FSH, anche in questo caso con un meccanismo di feedback negativo (McDonald 1989). Affinchè avvenga una normale spermatogenesi, all'interno del testicolo sono ritenute essenziali elevate concentrazioni tissutali di androgeni. Siccome la concentrazione di testosterone nel liquido interstiziale determina sia la quantità di

androgeni disponibile per le cellule del Sertoli sia la quantità che si diffonde nel sangue, si riconosce la necessità di meccanismi locali capaci di monitorare e regolare i livelli intratesticolari di testosterone. Questi meccanismi locali dovrebbero essere capaci di garantire elevati livelli di testosterone in periodi di bassi livelli di LH, ossia tra i picchi di quest'ormone (Sharpe 1984). Le proteine leganti gli androgeni assicurano l'accumulo di elevate concentrazioni di testosterone e diidrottestosterone all'interno dei tubuli seminiferi e nell'interstizio del testicolo. A questo livello le cellule bersaglio per il testosterone sono le cellule midodiali peritubulari e quelle del Sertoli. Inoltre le proteine leganti gli androgeni facilitano il trasporto di questi ormoni dal testicolo all'epididimo dove influiscono sul transito degli spermatozoi e sulla loro maturazione (Cunningham 2006).

Le cellule del Sertoli e quelle del Leydig sembrano interagire fra loro per via paracrina. Esistono quindi meccanismi locali che modulano la permeabilità capillare per il controllo del livello di testosterone; questi meccanismi vengono controllati dall'interazione tra l'LH e un fattore (LHRH testicolare) prodotto localmente dalle cellule del Sertoli. Cambiamenti nella permeabilità dei capillari testicolari possono potenzialmente influenzare i livelli intratesticolari di testosterone in diverse maniere: 1) alterando la frequenza di entrata dell'LH nel testicolo, influenzando così la secrezione di testosterone 2) alterando il volume di liquido interstiziale in cui viene secreto il testosterone, alterando in questo modo la concentrazione intratesticolare effettiva di testosterone 3) essendo la diffusione del testosterone dal liquido interstiziale presumibilmente determinata dalla differenza della sua concentrazione in questi due compartimenti, ciascuno dei due precedenti effetti potrebbe causare cambiamenti nel drenaggio venoso dei testicoli (Sharpe 1984).

Il ruolo del Follicle Stimulating Hormone (FSH) nella funzione riproduttiva maschile è ancora oggi un tema dibattuto, in particolare da quando studi effettuati su topi ipogonadici e su uomini con mutazioni del recettore per l'FSH hanno dimostrato che questo ormone non è un requisito assoluto per la fertilità maschile. Studi recenti dimostrano come l'FSH sia essenziale perché la spermatogenesi risulti quantitativamente normale. L'FSH regola infatti la

funzione della cellula del Sertoli e, tramite fattori di crescita prodotti da questa cellula, interviene anche nella regolazione della funzione della cellula del Leydig contribuendo pertanto, direttamente e indirettamente, alla spermatogenesi. FSH e testosterone agiscono separatamente ma sinergicamente nel sostenere vari stadi della spermatogenesi, dalla divisione degli spermatogoni fino al rilascio dello spermatozoo. L'azione dell'FSH può essere vista come un'amplificazione di un livello basale di spermatogenesi indotta dal testosterone intratesticolare. Una produzione massimale di spermatozoi si ottiene solo con uno stimolo combinato di FSH e LH (quindi testosterone) che esercitano sinergicamente un'azione sulla prima generazione di spermatogoni differenziati per amplificare la popolazione di questo tipo di cellule, che risulta aumentato di numero e anche di qualità. Diversi studi evidenziano come i livelli di FSH correlino inversamente non solo con la concentrazione spermatica ma anche con la motilità e con la morfologia. Una correlazione specifica tra i livelli plasmatici di FSH e parametri seminali è stata riscontrata in diversi studi tanto che i livelli di FSH possono essere considerati markers di spermatogenesi e di funzionalità delle cellule del Sertoli (Turchi 2007). Il potere predittivo del dosaggio dell'FSH se considerato in una popolazione di soggetti fertili e infertili, è però basso. Da diversi studi risulta evidente che un valore di FSH entro i valori di riferimento non è sufficiente per escludere una patologia testicolare e che valori di riferimento ben codificati non sono ancora ben definiti (Foresta et al 2007). Esistono diverse metodiche per la determinazione dell'FSH (Radicioni 2007). Tra queste, la metodica in chemiluminescenza (IMMULITE 2000 – Medical Systems S.p.A.), utilizzata anche per la determinazione di testosterone e progesterone (Stelletta et al 2008).

1.1.2 Fattori intratesticolari di controllo della funzionalità testicolare (tratto da *“Intratesticular factors controlling testicular function”* Sharpe 1984)

“Esistono due fondamentali ragioni per cui i testicoli dovrebbero avere meccanismi di controllo locali della propria funzionalità: 1) l'organizzazione strutturale del testicolo 2) l'organizzazione e il controllo ormonale della spermatogenesi.

I testicoli dei mammiferi sono suddivisi in due compartimenti: i tubuli seminiferi (non vascolarizzati) e l'interstizio (vascolarizzato), che contiene, oltre ai vasi sanguigni, le cellule del Leydig e macrofagi. Siccome i tubuli seminiferi generalmente costituiscono più del 90% della massa testicolare e siccome l'intensa e continua moltiplicazione cellulare della spermatogenesi è estremamente esigente per quanto riguarda energia e nutrimento, è ovvia la necessità di fornire un supporto nutritivo adeguato ai tubuli seminiferi in assenza di una vascolarizzazione diretta. E' probabilmente per questa ragione, che nella maggior parte dei mammiferi esiste una notevole quantità di fluido interstiziale che circonda i tubuli seminiferi e le cellule del Leydig e riempie gli spazi dell'interstizio, perché è questo fluido che deve trasportare tutti gli ormoni e sostanze nutritive dal circolo sanguigno. Essendo il fluido interstiziale formato a partire da filtrazione capillare, è ovvio che la sua velocità di formazione sarà importante nel determinare l'apporto nutritivo e ormonale complessivo. E' necessaria una regolazione della permeabilità capillare nei testicoli per garantire il corretto apporto nutritivo ed è logico aspettarsi che questa regolazione sia controllata a livello locale.

Un altro aspetto importante della struttura testicolare è la presenza di barriere di trasporto selettive, che operano a tre diversi livelli. La prima è a livello dell'endotelio vascolare. La seconda sembra essere localizzata a livello delle cellule mioidi che circondano i tubuli seminiferi. La terza, e più importante, è la barriera costituita dalle tight-junctions tra le cellule del Sertoli, che funzionalmente impedisce a molti composti presenti nel sangue e nel liquido interstiziale di raggiungere il compartimento luminale, permettendo così lo stabilirsi di un ambiente unico per lo sviluppo delle cellule germinali aploidi. La presenza di queste barriere selettive permette la creazione di microambienti unici non solo all'interno dei tubuli seminiferi, ma anche nello spazio interstiziale. Questo è probabilmente un requisito essenziale per l'interazione locale tra i due compartimenti testicolari perché garantisce la concentrazione locale dei fattori che fungono da mediatori in questa interazione.

E' sempre più ovvio che ogni fase del complesso processo della spermatogenesi ha requisiti diversi e che nel corso del ciclo spermatogenico la funzione delle

cellule del Sertoli varia ciclicamente a seconda di questi requisiti. Ciò significa che le cellule del Sertoli in tubuli seminiferi adiacenti potrebbero svolgere funzioni diverse e secernere simultaneamente prodotti diversi, nonostante entrambe siano esposte ad una stimolazione ormonale simile. In questa situazione è ovvio che devono operare meccanismi locali.

Il fattore più importante prodotto nei testicoli è il testosterone, perché non solo guida la spermatogenesi con i suoi effetti locali sulle cellule del Sertoli, ma una volta in circolo ha un serie di importanti effetti secondari sugli organi riproduttori e non riproduttori. Siccome la concentrazione di testosterone nel liquido interstiziale determina sia la quantità di androgeni disponibile per le cellule del Sertoli sia la quantità che si diffonde nel sangue, si riconosce la necessità di meccanismi locali capaci di monitorare e regolare i livelli intratesticolari di testosterone. Questa necessità si rende ancora maggiore per l'esistenza delle normali fluttuazioni nei livelli testicolari di testosterone, dovute alla pulsatilità nella secrezione dell'LH. Quindi, se è importante mantenere alti i livelli intratesticolari di testosterone, potrebbero essere necessari meccanismi locali che li garantiscano in periodi in cui è basso l'LH, ossia tra i picchi di quest'ormone. Tuttavia, questa necessità esiste solo nel momento in cui diventano essenziali elevati livelli intratesticolari di testosterone.

I livelli di testosterone nel fluido interstiziale variano molto e sono in dipendenza dell'età. In un ratto adulto l'intervallo di concentrazione è 150-1000 ng/ml, con la maggior parte dei valori compresi tra 250-450 ng/ml. I valori corrispondenti alla quantità totale di testosterone testicolare sarebbero 150-350 ng/testicolo. In passato, molti studi hanno dimostrato che la spermatogenesi può essere mantenuta in ratti ipofisectomizzati se i livelli di testosterone nei testicoli sono solo il 10-20% del normale. Questi risultati dicono che il livello di testosterone presente nei testicoli è eccessivo rispetto a quello richiesto fisiologicamente. Tuttavia, in quelli stessi studi il normale peso testicolare non era stato mantenuto e la spermatogenesi era solo stata mantenuta qualitativamente. Un altro studio ha dimostrato che in ratti ipofisectomizzati la spermatogenesi può essere mantenuta quantitativamente solo se i livelli di testosterone sono nel range normale. E' anche stata effettuata la conta delle varie cellule germinali nel VII stadio del ciclo

spermatogenico ed è riconosciuto che è fortemente androgeno-dipendente. Inoltre, sembra che siano i tubuli seminiferi al VII stadio ad esercitare un effetto locale sulla dimensione delle cellule del Leydig adiacenti ad essi e che contengano la più elevata concentrazione di testosterone.

Esistono, dunque, due ragioni tra di loro correlate per cui i livelli intratesticolari di testosterone necessitano di essere controllati. La prima è la necessità che i livelli di testosterone vengano mantenuti nel range necessario per il massimo supporto alla spermatogenesi, la seconda è la necessità di assicurare livelli particolarmente elevati di testosterone in vicinanza dei tubuli seminiferi che si trovano nel VII stadio. Se queste condizioni siano separate o siano la stessa non è ben chiaro. E' dunque difficile dire se i livelli intratesticolari di testosterone siano normalmente regolati per testicolo o se siano regolati localmente in aree discrete del testicolo, nonostante non si sappia come tali differenze potrebbero essere mantenute. Tuttavia, c'è chiara evidenza che questi gradienti di concentrazione locali possono formarsi, visto che l'impianto di androgeni o antiandrogeni nel testicolo risultano rispettivamente nella stimolazione o inibizione della spermatogenesi solo nell'immediata vicinanza degli impianti.

Nonostante si possa comprendere perché i livelli di testosterone debbano essere mantenuti elevati, perché questo ruolo non potrebbe essere svolto dall'LH, che è il regolatore primario della secrezione di testosterone? La risposta potrebbe stare nel fatto che è più accurato effettuare un controllo locale dei livelli di testosterone, soprattutto se sono richieste differenze di concentrazione all'interno del testicolo. Inoltre, essendo questa regolazione a beneficio delle cellule del Sertoli è più logico per questa cellula effettuare un controllo locale a feedback sulle adiacenti cellule del Leydig che agire tramite un feedback sull'asse ipotalamo-ipofisario.

Se la regolazione intratesticolare dei livelli di testosterone è importante, si può dire che: 1) dovrebbero essere presenti meccanismi che permettano questo controllo, 2) questi meccanismi dovrebbero utilizzare l'LH e altri fattori prodotti localmente con i quali interagisce l'LH e 3) essendo la cellula del Sertoli dipendente dal testosterone, dovrebbe essere questa cellula la fonte di tali fattori locali.

Esiste una lista di fattori locali che agiscono a livello testicolare. Tra questi l'unico che potrebbe svolgere la funzione di controllo descritta sopra è l'LHRH testicolare. La fonte di questo composto sono quasi certamente le cellule del Sertoli e esso agisce esclusivamente sulle cellule del Leydig perché solo queste cellule possiedono recettori per l'LHRH. Considerando il fatto che l'LHRH ipotalamico e i suoi analoghi agonisti sintetici interagiscono con i recettori per l'LHRH delle cellule del Leydig e che questa interazione risulta in effetti biologici, il potenziale ruolo dell'LHRH testicolare può essere studiato utilizzando sonde sintetiche. La natura degli effetti ottenuti con questi agenti artificiali non dovrebbero differire dall'azione endogena del peptide endogeno, anche se potrebbero esserci differenze nella durata ed entità degli effetti.

I due principali fattori che determinano il livello di testosterone nel fluido interstiziale sono: 1) la velocità di secrezione del testosterone, che è controllata dalla quantità di LH che raggiunge le cellule del Leydig e dall'effetto dei fattori locali, e 2) il volume, la velocità di formazione e la clearance di fluido interstiziale, perché questo non solo controllerà la velocità di trasporto dell'LH e altri composti alle cellule del Leydig, ma potrebbe anche influenzare la concentrazione di testosterone nel fluido interstiziale alterando il volume di fluido nel quale l'androgeno viene secreto.

Studi effettuati stabiliscono che l'LHRH testicolare ha un considerevole potenziale per influenzare la funzione complessiva del testicolo controllando i livelli di testosterone. Tuttavia, tutto ciò che si può affermare attualmente è la potenziale importanza di questo meccanismo. E' ancora da provare se questo meccanismo è coinvolto nella regolazione giornaliera della funzione testicolare. Nonostante ciò, si può sostenere che l'esistenza di questo meccanismo locale e l'efficacia dei suoi effetti biologici sono una forte indicazione della sua importanza. A determinare quando e forse quanto LHRH testicolare viene secreto nel liquido interstiziale potrebbe essere il livello di testosterone che agisce sulle cellule del Sertoli. L'LHRH agisce sulle cellule del Leydig per stimolare la secrezione di testosterone e, alterando la permeabilità dei vasi sanguigni vicini può controllare il volume di fluido interstiziale, esercitando così un ulteriore controllo sul livello di testosterone e, allo stesso tempo, alterando la velocità di

entrata dell'LH nell'interstizio e forse la velocità di uscita del testosterone da questo. Ciò che non si conosce precisamente è come LH e LHRH possano interagire per controllare questo processo, perché nonostante questa interazione sia stata dimostrata, gli effetti ottenuti sono stati chiaramente influenzati dalle dosi di agonista dell'LHRH e dal livello di esposizione all'LH. Non essendo conosciuto il livello di secrezione dell'LHRH testicolare è difficile dire quale sia l'effetto fisiologico dell'interazione tra questo peptide e l'LH. Un'altra barriera a questa speculazione è rappresentata dal non sapere se i livelli di testosterone sono uniformi in tutto l'interstizio o se variano da un'area ad un'altra a seconda di fattori e requisiti locali. Quest'ultima possibilità è possibile per la spiccata dipendenza dagli androgeni del VII stadio del ciclo spermatogenico e dall'evidenza che la dimensione delle cellule del Leydig peritubulari (ma non perivascolari) variano ciclicamente a seconda dello stadio del ciclo spermatogenico nei tubuli seminiferi adiacenti; quindi, cellule del Leydig vicine a tubuli che sono al VII o VIII stadio sono significativamente più grandi rispetto a quelle in qualsiasi altro stadio. Siccome questa differenza può solo essere spiegata da un effetto locale dei tubuli seminiferi sulle cellule del Leydig e, siccome cellule del Leydig di dimensioni maggiori secernono più testosterone di cellule di dimensioni minori, l'interpretazione logica è che i tubuli seminiferi al VII stadio controllano localmente il loro rifornimento di testosterone. Evidenze indirette suggeriscono che questa differenza nella concentrazione di testosterone potrebbe essere mantenuta, ma non si conosce come. È facile comprendere come cambiamenti strettamente localizzati nella permeabilità capillare, accoppiati con effetti diretti sulla steroidogenesi, potrebbero avvenire come risposta ad una secrezione localizzata di LHRH testicolare. In questa maniera, si potrebbero creare una serie di microambienti controllati all'interno del testicolo.

Un fatto certo è che l'LHRH compie la sua azione solo se lavora insieme all'LH, altrimenti la rapida caduta dei livelli di testosterone e il conseguente insuccesso nella spermatogenesi che conseguono all'ipofisectomia non sono spiegabili. È stato dimostrato che 3 giorni dopo l'ipofisectomia i livelli di testosterone sierici e intratesticolari cadono sotto il 10% del normale, ma possono essere ripristinati con una singola iniezione di agonista dell'LHRH. Il fatto che i livelli di

testosterone non vengono ripristinati dall'LHRH endogeno è una prova chiara che in vivo non agisce da solo.

Infine, non si dovrebbe dimenticare che il fatto che le cellule all'interno del testicolo possano controllare la permeabilità dei capillari testicolari, fa sorgere la possibilità del controllo di un qualsiasi fattore che dipenda dal fluido interstiziale per la sua distribuzione. Cambiamenti aberranti o difetti nella funzione dei capillari testicolari potrebbero spiegare molte disfunzioni dei testicoli. Riguardo a questo, l'ispessimento delle pareti dei vasi potrebbe essere significativo in almeno 3 situazioni (età avanzata, criptorchidismo, varicocele) nell'uomo, dove c'è una disfunzione delle cellule del Leydig e della spermatogenesi. Inoltre, il fatto che tali disfunzioni non siano uniformi all'interno del testicolo, suggerisce chiaramente un difetto locale come causa.” (Sharpe 1984)

1.2 Anatomia dei testicoli dei camelidi

I testicoli dei camelidi sono contenuti in un scroto non pendulo che forma una protuberanza subanale paragonabile a quella dei verri (Vaughan et al. 2003). Negli altri ruminanti domestici lo scroto pendulo ha un volume considerevole e condiziona la posizione verticale dei testicoli contenuti nel processo vaginale (Nickel et al. 1979). Mentre nei camelidi, normalmente, entrambi i testicoli sono piccoli ed ellittici, di dimensioni simili, turgidi alla palpazione e si muovono liberamente nello scroto. L'asse lungo di ogni testicolo è obliquo, con un orientamento caudodorsale-cranioventrale (Vaughan et al. 2003). Nel cavallo i testicoli sono orientati con l'asse longitudinale pressochè orizzontale, testa e corpo dell'epididimo sono applicati alla superficie dorsolaterale del testicolo (Nickel et al. 1979). Nei camelidi l'epididimo è piccolo e molto aderente al testicolo. La testa è di dimensioni maggiori rispetto alla coda. La testa dell'epididimo è situata cranioventralmente al testicolo, il corpo si estende medialmente e caudodorsalmente verso la coda, che è dorsale rispetto al testicolo. La testa e il corpo sono sede di maturazione degli spermatozoi, mentre la coda funge da deposito.

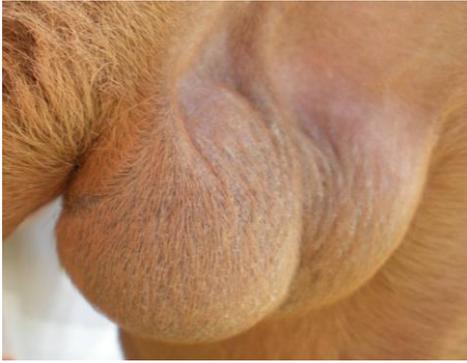


Figura n°1 - Nei camelidi sudamericani i testicoli si trovano appena al di sotto dell'arco ischiatico, molto vicini al corpo, e la cute a livello di scroto è spessa e grinzosa.

L'istologia dei testicoli dei camelidi è simile a quella delle altre specie di animali da reddito. La spermatogenesi nei camelidi è stata suddivisa in 8 stadi. Lo sviluppo inizia dagli spermatogoni situati nelle regioni più esterne dei tubuli seminiferi, procede poi a spermatociti primari, spermatociti secondari, spermatidi e spermatozoi, che sono adiacenti al lume dei tubuli seminiferi. I tubuli seminiferi negli alpaca hanno un diametro medio di 172-237 μm e nei lama un diametro medio di $223.07 \pm 19.8 \mu\text{m}$ (Vaughan 2003).

Ogni testicolo in un maschio adulto di alpaca misura approssimativamente 3.5-4 cm in lunghezza, 2.5-3 cm in larghezza e pesa 15-18g (tabella 1), pari allo 0.02-0.03% del peso corporeo. Nell'ariete tale percentuale è 1.4% e nel toro 0.18%. Cammelli di tre anni di età hanno testicoli con 7-10 cm di lunghezza che pesano 80-100gr ciascuno (Vaughan 2003). Nei camelidi sudamericani la dimensione testicolare è correlata con la produzione di sperma e la fertilità. La lunghezza testicolare media è correlata con il peso testicolare e potrebbe essere usata per valutare la dimensione testicolare, e quest'ultima potrebbe essere usata per stimare la capacità di produzione di sperma negli alpaca. La misurazione della lunghezza del testicolo può essere effettuata con un calibro di precisione o mediante l'utilizzo dell'ecografia. La differenza di lunghezza tra testicolo destro e sinistro dovrebbe essere inferiore al 15% (Tibary, Vaughan 2006).

Tabella 1 – Dimensioni e peso testicolare medi in alpaca, lama e vicuna (tratto da Vaughan 2003)

Età (mesi)	Alpaca		Lama		Vicuna
	Dimensione test (cm)	Peso test (g)	Dimensione test (cm)	Peso test (g)	Dimensione test (cm)
6	1.0x0.4	0.6	2.4x1.4	na	0.7x0.3
12	2.3x1.5	2.9	3.4x2.3	5.1	1.1x0.7
18	2.8x1.9	6.6	3.5x2.6	14	1.5x0.8
24	3.3x2.2	9.9	3.9x2.3	17.4	2.1x1.3
30	3.6x2.3	13.9	4.4x2.5	17.8	na
36	3.6x2.4	13.6	4.5x2.7	18.2	2.5x1.4
stalloni	3.7x2.4	17.2	5.4x3.3	na	3.3x1.9

Nei camelidi sudamericani l'esame ecografico dello scroto e dei suoi contenuti viene effettuato con l'animale in stazione quadrupedale. E' preferibile utilizzare una sonda lineare da 7,5 MHz. Ogni testicolo viene esaminato appoggiando la sonda in posizione verticale e poi orizzontale, esplorando l'intera superficie dell'organo. In un animale normale si riconosce un'area periferica di tessuto omogeneo corrispondente al parenchima testicolare ed un'area centrale più ecogena corrispondente alla rete testis. Il parenchima testicolare perde la sua apparenza omogenea in presenza di lesioni localizzate come cisti o fibrosi. Un aumento dell'ecogenicità è generalmente dovuto ad alterazioni degenerative. Un accumulo di fluidi può essere un reperto riscontrabile a livello della tonaca albuginea (idrocele), del parenchima (cisti testicolari) o dell'epididimo (cisti epididimali) (Tibary, Vaughan 2006).

Nei camelidi la termoregolazione vascolare potrebbe essere più importante della termoregolazione muscolare vista la presenza di uno scroto non pendulo. L'arteria testicolare è convoluta e contorta. Il plesso pampiniforme delle vene testicolari avvolge le arterie e raffredda, per un meccanismo di raffreddamento controcorrente, il sangue arterioso che entra nello scroto. Le strutture muscolari dello scroto e del cordone spermatico (dartos e muscolo cremastere) elevano il testicolo, in associazione ad un ispessimento della cute scrotale, in presenza di

temperature basse, e si rilassano leggermente in presenza di temperature più elevate. La cute dello scroto è relativamente spessa e potrebbe essere un adattamento per proteggere i testicoli da una castrazione accidentale durante un combattimento tra maschi (Vaughan et al. 2003).

1.3 Test funzionali

Il GnRH (Gonadotropin-releasing hormone) è un decapeptide ipotalamico neuronale che gioca un ruolo centrale nella regolazione della fisiologia riproduttiva dei mammiferi, principalmente regolando la sintesi e il rilascio delle gonadotropine ipofisarie. Anche se l'ipotalamo e l'ipofisi sono rispettivamente la principale fonte e bersaglio del GnRH, diversi studi hanno riportato un'origine extraipotalamica del GnRH, così come una presenza extraipofisaria di recettori per il GnRH in numerosi tessuti periferici, tra cui gli organi riproduttori di diverse specie di mammiferi. Uno studio effettuato *in vitro* ha dimostrato che il GnRH influisce direttamente sull'attività endocrina del testicolo di alpaca (Catone et al 2009). Nello specifico, questo decapeptide, legandosi ai suoi recettori delle cellule del Leydig, attiva la sintesi di testosterone e delle principali prostaglandine coinvolte nei processi riproduttivi, $PGF2\alpha$ e $PGE2$. Quindi, anche nell'alpaca, il GnRH è uno dei principali fattori che modulano l'attività testicolare mediante fattori paracrini e/o autocrini (Catone et al 2009).

Il trattamento con GnRH aumenta le concentrazioni plasmatiche di LH (quindi testosterone) e FSH, e potrebbe essere utile per predire la fertilità in maschi riproduttori. In uno studio effettuato su tori è stata riscontrata una stretta correlazione tra classifiche per performance riproduttiva (libido e gravidanze ottenute) e concentrazioni plasmatiche di testosterone in seguito a somministrazione di GnRH (Post et al 1987). Un altro studio effettuato su tori ha messo in evidenza la possibilità di poter predire il potenziale riproduttivo in base alle concentrazioni plasmatiche di testosterone in seguito al trattamento con GnRH (Wekerle 1989). In uno studio recente, giovani tori di razza frisona trattati con GnRH hanno mostrato un aumento della temperatura superficiale scrotale; in quello studio la misurazione della densità ecografica testicolare e temperatura

superficiale scrotale in seguito a trattamento con GnRH hanno aumentato la misurazione della dimensione testicolare per predire il numero e la percentuale di spermatozoi vivi (Gabor et al 2001).

1.4 Tecnica termografica

1.4.1 La termografia

Per termografia s'intende l'utilizzo di una telecamera ad infrarossi, o termocamera, per visualizzare e misurare a distanza l'energia termica irradiata da un oggetto, partendo dal rilevamento dell'intensità della radiazione infrarossa emessa, al fine di conoscere la temperatura superficiale e la sua distribuzione sulla superficie presa in considerazione. Quello che si ottiene è un'immagine termica.

Il calore può essere trasmesso essenzialmente in tre modalità: conduzione, convezione e irraggiamento. La prima avviene nel caso di corpi messi direttamente a contatto, la seconda è quella tipica dei fluidi o dei gas in movimento, la terza avviene indipendentemente dalla presenza di un mezzo e non è altro che una forma di trasmissione delle onde elettromagnetiche.

La termometria di contatto è una modalità di rilevamento della temperatura di un oggetto dove la trasmissione di calore al dispositivo di misura avviene prevalentemente per conduzione, con il vantaggio di consentire, attraverso l'inserimento del dispositivo, misurazioni all'interno del corpo in esame, come ad esempio un comune termometro al mercurio.

La termografia rappresenta invece una visualizzazione bidimensionale della misura dell'irraggiamento, con il vantaggio però di ottenerla ad una certa distanza dall'oggetto in esame, misurando solo la temperatura superficiale del corpo e fornendo mappe di ampie superfici e con tempi di risposta molto più rapidi rispetto alla termometria di contatto.

1.4.2 La termocamera (funzionamento)

Il funzionamento della termocamera è basato sulla rilevazione senza contatto dell'energia termica emessa dagli oggetti con detector dotati di proprietà piroelettriche. Questa energia viene convertita in un segnale elettronico che viene successivamente elaborato da software specifici che producono immagini digitali ed eseguono calcoli analitici della temperatura.

Per visualizzare le immagini ad infrarosso, immagini termiche o radiazioni di calore, si utilizzano diverse colorazioni in scala che mettono in evidenza i punti caldi, freddi e le differenze di calore esistenti tra le varie parti della superficie esaminata. Si ottiene così una rappresentazione del gradiente termico tra zone diverse del corpo e un modello della distribuzione termica dell'oggetto.

La radiazione ad infrarosso può essere emessa, assorbita, riflessa e trasmessa. La termocamera, dunque, non rileva solo la radiazione prodotta dal calore dell'oggetto in esame, ma anche quella che origina dalle zone circostanti e viene riflessa dall'oggetto. Queste radiazioni emesse e riflesse dall'oggetto variano in base all'assorbimento atmosferico, e il valore della misurazione viene influenzato dalla temperatura ambientale. In questo senso la misurazione di temperature basse è più critica di quella di temperature alte, in quanto questi fattori di disturbo sono più forti nel primo caso. Per una rilevazione precisa è quindi opportuno tenere in considerazione questi fattori, inserendo dei parametri che permettano di correggere eventuali deviazioni generate dalla situazione ambientale in cui si opera e dalle caratteristiche dei corpi oggetto di misurazione. Tali parametri sono l'emissività dell'oggetto, la temperatura riflessa, la temperatura atmosferica, la distanza tra oggetto e termocamera e l'umidità relativa.

L'emissività dell'oggetto si riferisce alla quantità di radiazione emessa da questo. Ha un valore compreso tra 0 e 1. Un corpo con emissività vicina allo 0 riflette tutta l'energia proveniente dall'ambiente, mentre con emissività prossima all'1 il corpo tende ad assorbire tutta l'energia incidente su di esso senza riflettere. Per valori compresi tra 0 e 1 parte della radiazione viene assorbita e parte riflessa. I valori di emissività dei vari materiali sono riportati nei manuali corredati alla

strumentazione, ma per ottenere risultati migliori, spesso i rilevatori termografici prevedono un sistema di correzione che tiene conto del reale coefficiente di emissività, che può essere misurato direttamente sul corpo in esame, utilizzando una termocoppia o materiali di riferimento di cui si conosce già il valore di emissività. L'emissività per la cute degli animali è stata definita pari a 0,93.

La temperatura ambientale riflessa è il parametro che consente di bilanciare la radiazione riflessa sull'oggetto e quella emessa dall'atmosfera, tra la termocamera e l'oggetto. E' importante impostarla soprattutto quando l'emissività è bassa, la distanza è molto elevata e la temperatura del corpo simile a quella dell'ambiente.

La distanza si deve impostare per bilanciare l'assorbimento della radiazione tra l'oggetto e la termocamera dovuto alla "trasmittanza", che diminuisce all'aumentare della distanza ed è determinata dall'attenuazione delle radiazioni emesse dal corpo da parte dell'atmosfera.

L'umidità relativa influenza in certa misura la "trasmittanza". Tuttavia, per brevi distanze e valori di umidità non estremi si può utilizzare il valore predefinito pari al 50%.

1.4.3 Esecuzione di una termografia

Prima di eseguire la raccolta dell'immagine lo strumento deve essere tarato affinché si misuri la temperatura superficiale reale dell'oggetto studiato e i fattori di disturbo derivanti dall'ambiente e dalle caratteristiche della struttura vengano limitati.

L'impostazione dello strumento si effettua selezionando dal menu delle funzioni "Analisi" e poi, dal sottomenù si accede alla regolazione dei "Parametri oggetto" per impostare:

- Emissività
- Temperatura ambientale
- Temperatura riflessa
- Distanza
- Umidità

Per ottenere una buona termografia è importante cercare di standardizzare l'ambiente e il soggetto.

1.4.4 Applicazioni della termografia in medicina

La termografia ad infrarossi è un buon strumento diagnostico e viene applicato come metodo non invasivo, affidabile e rapido per creare una mappa visiva dei gradienti di temperatura esistenti sulla superficie corporea. Le informazioni termiche rilevate dallo strumento riflettono il metabolismo tissutale e la circolazione ematica, che ha un ruolo fondamentale nella regolazione della temperatura corporea. Con la termografia è possibile evidenziare un aumento o una diminuzione del flusso sanguigno sottostante, conseguente ad uno stimolo patologico o ad un'alterazione dello stato fisiologico dell'animale. Regioni localizzate di ipertermia potrebbero essere associate ad un aumento del flusso sanguigno arterioso, mentre aree di ipotermia potrebbero indicare una diminuzione della perfusione ematica in un certo distretto o la caduta del tono vasomotorio. Esempi di fenomeni che determinano un abbassamento della temperatura locale sono i processi di degenerazione, le fibrosi, l'involutione di organi parenchimosi e i problemi circolatori, mentre un aumento della temperatura potrebbe essere dato da un'iperemia dovuta ad un processo infiammatorio.

In medicina veterinaria la termografia è stata utilizzata in diversi ambiti per diversi scopi. Nel cavallo sportivo, come strumento complementare nella diagnosi delle patologie del sistema locomotore (Turner 1991; Eddy 2001). Nell'allevamento della vacca da latte, per il rilevamento precoce dell'estro (Hurnik et al. 1985), delle mastiti (Scott et al. 2000; Berry et al. 2003) e delle zoopie (Nikkhah et al. 2005). Nella produzione suinicola come strumento di ricerca per investigare la fisiologia dell'utilizzazione di energia (Tivey e Benhazi 2002) e per rilevare i cambiamenti della temperatura superficiale media del corpo (Loughmiller et al. 2001). Nell'industria avicola come potenziale sistema per l'identificazione di soggetti febbrili nel caso di una patologia, come ad esempio l'influenza aviaria (Tessier et al 2003). Negli animali selvatici per il censimento

(Garner et al. 1995), diagnosi precoce di zoopia negli erbivori, rilevazione dell'estro e diagnosi di gravidanza. Ed infine come indicatore di stress per valutare il benessere animale (Schaefer et al 1988), per la valutazione della qualità delle strutture negli allevamenti (Navarotto et al 2003) e per l'analisi dei foraggi insilati (Cassini et al 1993).

1.5 Tecnica ecografica

I rilievi ecografici di questo lavoro hanno interessato lo studio dell'intensità ecografica testicolare e lo studio della flussimetria testicolare. Per quest'ultima si è fatto uso dell'ecografia doppler. In particolare, le metodiche utilizzate sono state il Color Doppler e il Doppler pulsato.

1.5.1 Principi basilici dell'ecografia

L'ultrasuono è caratterizzato da onde sonore con una frequenza superiore rispetto al limite massimo udibile dall'orecchio umano, approssimativamente 20000 cicli per secondo (20 kHz). Nell'esame diagnostico ecografico le frequenze utilizzate sono nell'intervallo compreso tra 2 e 10 MHz. Una sonda può emettere onde sonore di una sola frequenza o di frequenze multiple. L'operatore deve selezionare la frequenza appropriata a seconda della regione anatomica da esaminare.

La frequenza è definita come il numero di volte che l'onda viene ripetuta (cicli) in un secondo. La lunghezza d'onda è la distanza che compie un'onda in un ciclo. Più corta è la lunghezza d'onda migliore è la risoluzione dell'immagine. A frequenze dell'ordine di milioni di cicli per secondo corrispondono lunghezze d'onda corte, che sono essenziali per un'alta risoluzione dell'immagine. Negli apparecchi ecografici la velocità del suono nei tessuti molli viene considerata come costante, anche se esistono piccole differenze. Dunque, essendo la velocità del suono indipendente dalla frequenza e quasi costante (1540 m/sec) nei tessuti molli corporei, selezionando una sonda con frequenza maggiore si diminuisce la lunghezza d'onda del suono emesso, ottenendo così una risoluzione migliore. La

profondità che le onde ultrasonore riescono a raggiungere nei tessuti molli è direttamente relazionata alla frequenza impiegata. Aumentando la frequenza diminuisce la penetrazione, ma aumenta, come detto prima, la risoluzione.

Selezionare una sonda, dunque, significa selezionare la frequenza degli ultrasuoni che verrà utilizzata nell'esame. La frequenza emessa da una specifica sonda dipende dalle caratteristiche dei cristalli piezoelettrici contenuti in essa. La frequenza di un cristallo è intrinseca e non può essere cambiata dall'operatore. Esistono tuttavia sonde che emettono frequenze diverse, permettendo così la massima risoluzione possibile per una determinata profondità senza dover cambiare sonda. Si può dire, dunque, che l'obiettivo sia selezionare la frequenza più alta in grado di penetrare alla profondità desiderata.

Gli ultrasuoni emessi dalla sonde vengono prodotti in maniera pulsatile. L'immagine si forma dagli echi che ritornano dai tessuti alla sonda in seguito ad ogni emissione. Perciò, è necessario un intervallo di tempo adeguato per acconsentire il ritorno degli echi prima dell'emissione dei successivi ultrasuoni. Normalmente l'emissione avviene per meno dell'1% del tempo, mentre la ricezione degli echi per più del 99%.

Il fascio di ultrasuoni e gli echi di ritorno vengono attenuati nel passare attraverso i tessuti. Per cui, più lontano si trova un'interfaccia riflettente dalla sonda, più debole sarà l'eco di ritorno. Le macchine ecografiche possiedono pannelli di controllo che permettono di aumentare l'intensità del suono emesso nei tessuti o di amplificare elettronicamente gli echi di ritorno per compensare questa attenuazione.

Come già detto, gli echi riflessi dai tessuti alla sonda sono la base per la formazione dell'immagine. Interfacce grandi in relazione al fascio di ultrasuoni sono riflettori speculari. Interfacce che non riflettono il suono verso il trasduttore non contribuiscono alla formazione dell'immagine. Perciò, esaminare appoggiando la sonda con angoli diversi può rendere diverse interfacce perpendicolari ad essa, migliorando la qualità dell'immagine.

Per impedenza acustica s'intendono le caratteristiche di riflessione o trasmissione di un tessuto. Le differenze di densità tra i tessuti può essere utilizzata per stimare l'impedenza acustica dei tessuti molli, essendo la velocità del suono in

essi quasi costante. L'impedenza acustica può essere definita dalla seguente equazione:

$$\textit{Impedenza acustica (Z)} = \textit{velocità (v)} \times \textit{densità del tessuto (p)}$$

E' la differenza di impedenza acustica tra i tessuti ad influenzare gli echi di ritorno. L'ampiezza dell'eco di ritorno è proporzionale alla differenza di impedenza acustica tra due tessuti. Esistono solo piccole differenze di impedenza acustica tra i tessuti molli corporei. Questo è ideale ai fini della creazione dell'immagine perché solo una piccola percentuale del fascio di ultrasuoni viene riflessa al livello di queste interfacce, mentre la maggior parte viene trasmessa ed è disponibile per la creazione di immagini di strutture più profonde. L'osso e il gas hanno rispettivamente un'impedenza acustica alta e bassa. L'aria è meno densa e più comprimibile dei tessuti molli e trasmette il suono a velocità inferiori. L'osso è più denso e meno comprimibile dei tessuti molli e trasmette il suono a velocità superiori. Ciò significa che quando il fascio di ultrasuoni incontra un'interfaccia tessuto molle-osso o tessuto molle-gas, quasi tutti gli ultrasuoni vengono riflessi e solo pochi rimangono disponibili per la formazione dell'immagine di strutture più profonde (Nyland, Matoon 2002).

1.5.2 Basi fisiche del Doppler

L'effetto Doppler, per quanto riguarda l'ecografia, risulta da un apparente spostamento della frequenza sonora nel momento in cui le onde sonore vengono riflesse da oggetti in movimento, normalmente globuli rossi. Se il movimento è verso la sonda, la frequenza degli echi di ritorno è maggiore rispetto a quella delle onde trasmesse. Se il movimento è in allontanamento dalla sonda, gli echi di ritorno hanno una frequenza inferiore rispetto alle onde trasmesse. La differenza tra le frequenze trasmesse e ricevute è chiamata "Doppler shift". Maggiore è il Doppler shift, maggiore è la velocità del flusso preso in considerazione. L'equazione per il Doppler shift è la seguente:

$$f = 2Fv \cos(a)/c$$

dove f è la frequenza del Doppler shift, F è la frequenza originale del suono trasmesso, v è la velocità del flusso, a è l'angolo tra il raggio di ultrasuoni e la

direzione del movimento del flusso e c è la velocità degli ultrasuoni nel tessuto. L'equazione viene riarrangiata nella seguente maniera

$$v = fc/2F \cos(a)$$

Quando il raggio di ultrasuoni è parallelo alla direzione del flusso (l'angolo di incidenza si avvicina allo 0 e il $\cos(a)$ si avvicina a 1), l'angolo di incidenza ha un effetto minimo sulla misurazione e il risultato è più attendibile. Angoli di incidenza superiori a 60° determinano notevoli cambiamenti nella velocità calcolata, anche se spesso, soprattutto nella valutazione di vasi periferici e superficiali, è difficile minimizzare questo errore.

L'informazione viene presentata sul monitor dell'ecografo come un tracciato spettrale in funzione del tempo (diagramma di flusso), con la velocità (cm/sec) sull'asse verticale e il tempo sull'asse orizzontale. La linea orizzontale di base rappresenta il punto dove non c'è spostamento di frequenza (doppler shift) da parte degli echi di ritorno, ossia, non c'è flusso. Il tracciato spettrale compare, per convenzione, al di sopra della linea di base quando il flusso è diretto verso la sonda e al di sotto quando il flusso è in allontanamento dalla sonda. Lo spessore dello spettro indica la variabilità delle frequenze presenti in ogni determinato momento. La velocità media e lo spostamento di frequenza vengono calcolati dall'ecografo (Nyland, Mattoon 2002).

1.5.3 Doppler pulsato, doppler continuo, color doppler

Le tipologie di ecografia Doppler normalmente utilizzate in medicina veterinaria sono il Doppler pulsato, il Doppler continuo e il color-doppler. Nel Doppler pulsato gli ultrasuoni vengono trasmessi in maniera intermittente e, nonostante gli echi di ritorno siano continui, la sonda percepisce solo quelli che giungono ad essa dopo un prestabilito intervallo di tempo, che corrisponde alla profondità del vaso. E' possibile quindi ottenere echi da una precisa profondità e valutare le caratteristiche del flusso all'interno di un volume campione, ignorando gli echi provenienti dalle altre posizioni. Questo processo selettivo è definito "range resolution". Il principale limite di questa metodica è la velocità massima che può essere accuratamente misurata. Per cui, per velocità elevate, che superano il

cosiddetto limite di Nyquist, si verifica il fenomeno dell' "aliasing", con la visualizzazione di una parte del tracciato spettrale dalla parte opposta della linea orizzontale di base. Con il Doppler continuo il fenomeno di aliasing non esiste, per cui è ideale per la misurazione di elevate velocità di flusso. Con questa metodica vengono studiati tutti i flussi lungo una linea di interrogazione e quindi non è possibile discriminare la profondità, ossia non è possibile effettuare la range resolution.

La metodica color-doppler utilizza la tecnologia del doppler pulsato con l'uso di mappe di colore sovrapposte all'immagine bidimensionale ottenibile con l'ecografo. Invece di ottenere un solo volume campione lungo una linea di scansione, è possibile analizzare diversi punti lungo diverse linee, che definiscono un'area campione detta "region of interest". In ogni volume campione si valutano dimensione, qualità e velocità media del flusso. La maggior parte degli ecografi utilizzano il rosso, il blu e il verde per produrre diverse sfumature di rosso, giallo, bianco e azzurro. Nelle macchine più moderne è possibile scegliere anche mappe di colore diverse. Normalmente, il flusso verso la sonda è visualizzato come rosso e il flusso in allontanamento dalla sonda come blu. Velocità crescenti vengono visualizzate come sfumature progressivamente più chiare del colore in questione. Il fenomeno dell'aliasing è presente a velocità inferiori paragonate a quelle che lo determinano nel doppler pulsato. Nel color-doppler l'aliasing si visualizza come un cambiamento brusco del colore nel senso opposto. Ad esempio, un flusso che si sposta verso la sonda, visualizzato quindi come rosso, all'aumentare della velocità si visualizza con sfumature sempre più chiare di rosso e una volta superato il limite di Nyquist, come sfumature chiare di blu che diventeranno progressivamente più scure. Un flusso turbolento può essere visualizzato dalla macchina con l'aggiunta di una tonalità di verde.

Uno dei principali vantaggi dell color-doppler rispetto alle metodiche di doppler spettrale, è la notevole velocità con cui si possono individuare zone in cui il flusso sanguigno è normale o anormale, grazie alla maggior ampiezza dell'area presa in considerazione con questa modalità. Un altro vantaggio è quello di permettere un miglior allineamento del doppler spettrale lungo una linea di interesse (Nyland, Mattoon 2002).

CAPITOLO II - Materiali e metodi

2.1 Gli alpaca

Le prove per lo svolgimento di questo lavoro sono state effettuate su cinque esemplari maschi di alpaca, provenienti dall'Azienda Agricola "Poggio Piero" situata a Montemassi (GR). Quattro dei cinque maschi appartengono alla razza huacaya, uno alla razza suri.

Animale 1: "Nerone", huacaya, nato il 12-09-2001

Animale 2: "Rubens", huacaya, nato il 30-09-2004

Animale 3: "Schumi", huacaya, nato il 11-09-2004

Animale 4: "Enrico", huacaya, nato il 14-05-2001

Animale 5: "El Mariachi", suri, nato il 27-09-2003

2.2 Test del GnRH

Sia i rilievi termografici che flussometrici effettuati nello studio sono stati condotti stimolando la funzionalità testicolare con il GnRH. In particolare, per le prove condotte si è utilizzato un analogo del GnRH (Buserelin acetato – *Receptal, Intervet Italia*), somministrandolo alla dose di 8,4 microgrammi (pari a 2 ml) i.v. all'inizio di ogni prova.

2.3 Termografia

2.3.1 La termocamera (caratteristiche tecniche)

Per il rilevamento delle immagini è stata utilizzata la termocamera modello ThermaCAM P25 della FLIR Systems. Le immagini sono state memorizzate dallo strumento in formato JPEG standard su scheda di memoria estraibile da 128 Mb e trasferite successivamente al computer per essere poi analizzate con il software Thermacam Researcher Basic 2.08.

Caratteristiche tecniche dello strumento:

- Campo di vista: 24°x18°
- Distanza minima di messa a fuoco: 0,3 m
- Risoluzione spaziale: 1,3 mrad
- Detector FPA microbolometrico non raffreddato di IV generazione
- Sensibilità termica a 50,60 Hz: 0,08°C a 30°C
- Campo spettrale: da 7,5 a 13 μm
- Intervallo di misura della temperatura: -40°C a +500°C
- Risoluzione delle immagini 320x240 pixel
- Frequenza di acquisizione immagine: 50 Hz
- Digitalizzazione immagini: 14 bit
- Funzioni di misura: puntatore
- Messa a fuoco: automatica o manuale
- Commento vocale: 30 secondi per ogni immagine
- Controllo remoto: RS 232
- Uscite Video: PAL e S-Video
- Indicatore dello stato della batteria, del supporto per il salvataggio e dello stato del sistema
- Visore monoculare a colori
- Alimentazione: 2 batterie Li-Ion ricaricabili, autonomia 2 ore di funzionamento continuato
- Caricamento nella termocamera o su supporto esterno con due vani

2.3.2 Rilievi termografici

Le immagini con la termocamera sono state ottenute in tre momenti diversi, così da ottenere tre serie di immagini per ogni soggetto relative a tre condizioni diverse. La prima serie è stata effettuata senza che i maschi avessero avuto contatto con le femmine per 2 mesi (**1°test**), la seconda dopo l'esposizione alle femmine senza monta (per 3 settimane, 2 volte a settimana per 15 minuti)(**2°test**) e la terza dopo la monta (per 3 settimane, 2 volte a settimana)(**3°test**). Ogni serie è stata ottenuta nell'arco di un'ora ed è costituita da tredici immagini. La prima immagine di ogni serie è stata acquisita a T0, momento in cui ad ogni animale è

stato somministrato per via endovenosa un analogo del GnRH (Buserelin) alla dose di 8,4 microgrammi. Le immagini successive sono state acquisite ad ogni cinque minuti partendo da T0 (T0, T5, T10, T15.....T60). Inoltre, a T0 e T60 sono stati ottenuti dei campioni di sangue da cui misurare la testosteronemia basale (T0) e la testosteronemia post-stimolazione (T60). Il sangue è stato prelevato dalla giugulare e i campioni sono stati raccolti in provette prive di anticoagulante, per essere successivamente centrifugati a 35 RPM per 10 minuti. Il siero è stato poi prelevato con una pipetta Pasteur e inserito in provette heppendorf per poter essere congelato, in attesa della successiva determinazione della testosteronemia.

In ogni sessione di acquisizione delle immagini gli animali sono stati legati alla longhina e disposti l'uno di fianco all'altro, con la coda alzata e legata in modo da tenere esposti i testicoli durante i 60 minuti della prova.

Le immagini termografiche sono state analizzate utilizzando un software specifico (Thermacam Researcher Basic 2.08, Flir System). Per l'analisi della temperatura scrotale sono state considerate separatamente due aree per ogni animale, Area1 e Area2, corrispondenti rispettivamente al testicolo sinistro e al testicolo destro (figura 2).

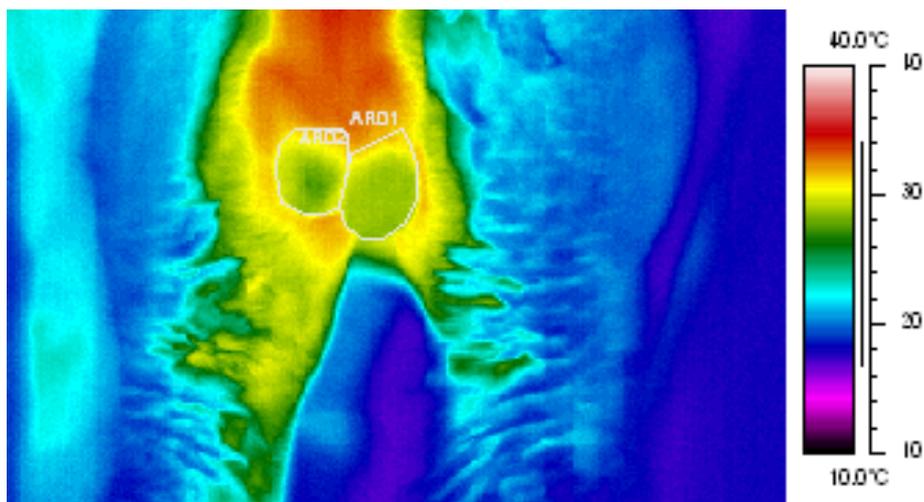


Figura 2 - Un esempio di immagine termografica ottenuta; si notano le due aree corrispondenti ai due testicoli.

2.4 Ecografia

2.4.1 L'ecografo

Per lo studio dell'intensità ecografica testicolare e della flussimetria si è utilizzato un ecografo di marca GE modello LOGIQ P5

Dimensioni: 135/141(max 165) x 43 x 64 cm

Peso: 75 kg

Voltaggio: 100-120 Vac o 200-220 Vac

Frequenza: 50-60 Hz

Potenza: max 750 VA

Output termico massimale: 2200 BTU/ora

Console: 3 porte per sonde, Hard Disk integrato (80 G), lettore DVD-R/W

Schermo: 1024x768 Area di registrazione: 800x600

2.4.2 Flussimetria

I rilievi ecografici per ottenere informazioni sulla flussimetria testicolare sono stati effettuati solamente su quattro dei cinque alpaca, per difficoltà nell'esecuzione delle prove sul quinto soggetto. Si è utilizzata una sonda microconvex 8C (6-10 MHz). A differenza della termografia, si è ottenuto solo una serie di immagini per ogni animale. Per ogni soggetto si è preso in considerazione separatamente ogni testicolo nei diversi tempi di acquisizione delle immagini.

Per l'esecuzione delle prove si è seguito il seguente protocollo: prelievo di sangue al tempo 0 (T0), acquisizione delle immagini a T0, iniezione i.v. di un analogo del GnRH (Buserelin acetato – *Receptal, Intervet Italia*, 8,4 microgrammi), prelievo di sangue ed acquisizione delle immagini ogni 10 minuti fino a T60. Il sangue è stato prelevato con lo scopo di poter ottenere un monitoraggio della testosteronemia durante i 60 minuti della prova in seguito alla stimolazione con GnRH. La metodica di prelievo e trattamento dei campioni di

sangue ottenuti è stata la stessa utilizzata durante i primi 3 test di stimolazione con il GnRH.

Per ogni soggetto si è proceduto all'identificazione dell'arteria testicolare con un approccio caudale rispetto al testicolo in posizione dorso-mediale. Una volta identificato il lume vasale con il color-doppler è stato utilizzato il doppler pulsato per visualizzare il diagramma di flusso dell'arteria testicolare da cui ottenere i parametri flussimetrici. Per ogni testicolo ad ogni momento prestabilito (T0, T10, T20... T60) si è salvato un'immagine con il diagramma di flusso da cui ricavare successivamente Velocità sistolica (VS), Velocità diastolica (VD), Indice di pulsatilità (PI) e Indice di resistività (RI).

Le formule utilizzate dall'ecografo per il calcolo dei diversi indici sono riportate di seguito (LOGIQ P5/A5 Advanced reference manual):

$$RI=(V_{max}-V_{diastolica})/V_{max}^1$$

$$PI=(V_{max}-V_{diastolica})/TAMAX^2$$

1. Vdiastolica = Vminima o Vfine-diastole
2. Velocità massima media nel tempo

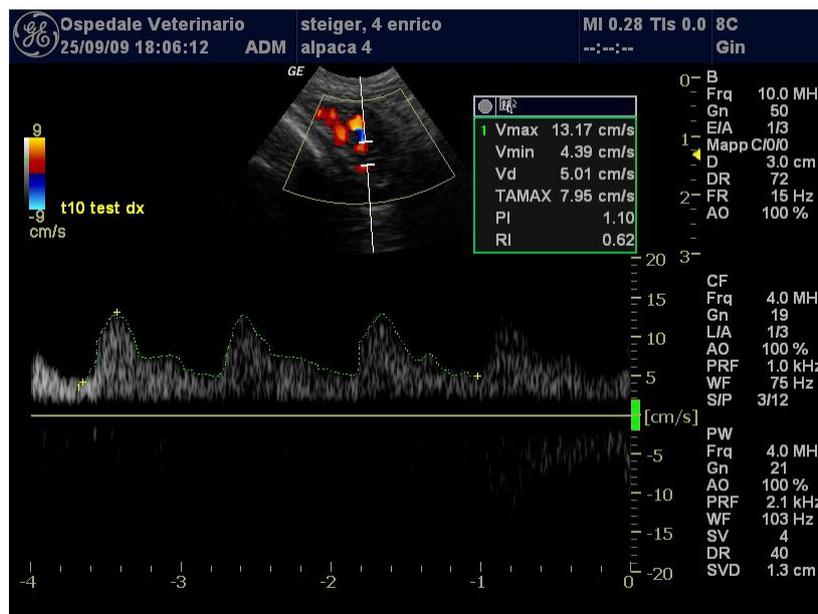


Figura 3 - Visualizzazione del diagramma di flusso dell'arteria testicolare con il doppler pulsato utilizzato ottenere i parametri flussimetrici.

Durante le prova i soggetti sono rimasti in stazione quadrupedale, con la coda rialzata e legata, tenuti alla longhina da un operatore.

2.4.3 Intensità ecografica testicolare

Il rilievo dell'intensità ecografica testicolare è stato effettuato sui cinque maschi per 4 volte, in momenti diversi. Si è utilizzato una sonda lineare 10L (6-10 MHz). Per ogni testicolo di ogni animale si è preso in considerazione solo il parenchima, escludendo il mediastino. Per ogni misurazione di ogni singolo testicolo sono state selezionate due aree distinte del parenchima separate tra loro, appunto, dal mediastino (figura 4). Per il calcolare il valore in decibels (dB) dell'intensità ecografica il software è stato incrementato con le misure dell'impedenza acustica, valutando la facilità con cui l'ultrasuono attraversa i diversi tessuti; il valore riscontrato è di solito negativo e risulta come proporzionale alla compattezza tissutale.

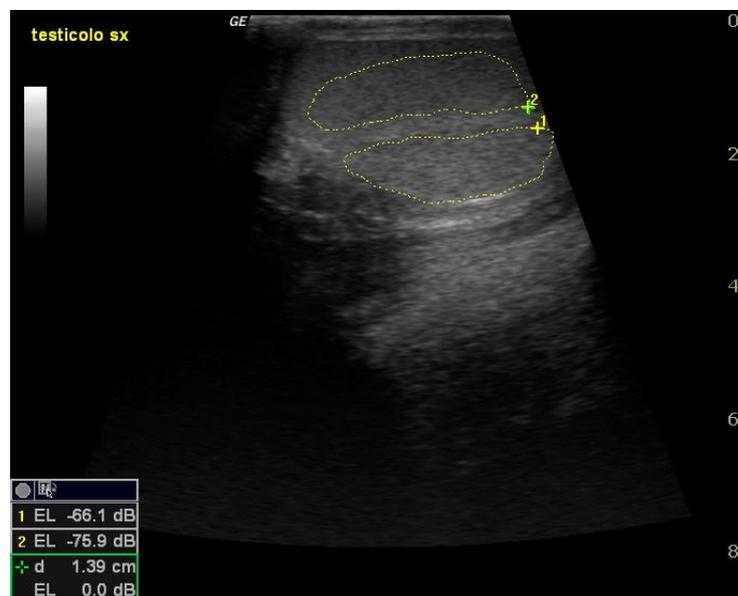


Figura 4 - Immagine ecografica del testicolo sinistro di uno dei soggetti. Si vedono le due aree di parenchima selezionate ai fini della misurazione dell'intensità ecografica testicolare.

2.5 Qualità seminale e dimensioni testicolari

Nel periodo di svolgimento delle prove di questo studio sulla funzionalità testicolare è stato possibile svolgere altri lavori con gli stessi esemplari di alpaca, tra cui uno studio sulla qualità seminale. Il seme dei cinque animali è stato raccolto durante un periodo di tempo compreso tra marzo 2009 e giugno 2010. Per la raccolta si è utilizzata una vagina artificiale modificata per camelidi sudamericani, in parte come suggerito da Bravo et al. (1997a, 2000) (figura 5). Le modificazioni hanno avuto come scopo principale quello di simulare la cervice, essendo l'interazione del pene con questa fondamentale nel processo di eiaculazione dell'alpaca. Le monte sono avvenute usando esemplari femmina come teaser.



Figura 5 – La vagina artificiale modificata per camelidi sudamericani utilizzata per la raccolta del seme.

I parametri considerati nella valutazione della qualità seminale sono viscosità, volume (ml), motilità % e concentrazione ($\times 10^6$ spz/ml). Il volume è sempre stato calcolato in ml, in base alla graduazione delle provette. La viscosità è stata valutata facendo cadere delle gocce di liquido seminale su un vetrino, tramite una pipetta Pasteur. Ad un plasma seminale completamente liquido corrisponde il numero 3, ad uno semiliquido corrisponde il numero 2, mentre ad un plasma seminale viscoso si associa il numero 1 (Bravo et al., 1997b). La motilità e la concentrazione percentuali sono state calcolate tramite l'uso di una camera di conta chiamata Cell VU® Sperm Counting Chamber. Cell VU® è una camera di conta preconfezionata fornita dall'AMI, Advanced Mediatech International. È simile ad un emocitometro ma è stata scelta perché il seme non deve essere diluito. La diluizione che sarebbe necessaria per la conta cellulare con un emocitometro rende difficile la conta stessa, perché l'alta viscosità del seme negli alpaca impedisce una distribuzione omogenea del diluente e degli spermatozoi. Con Cell VU® invece basta apporre 10 μ l di seme senza diluizione sul vetrino e

coprire con l'apposito coprioggetto. La camera di conta è costituita da un quadrato, formato a sua volta da 16 quadrati più piccoli. La procedura di conta consiste nel segnare gli spermatozoi motili e gli spermatozoi totali (motili + non motili) che si contano all'interno di cinque dei quadrati più piccoli. Il totale di spermatozoi motili va diviso per cinque e moltiplicato per dieci, per ottenere i milioni (10^6) di spermatozoi motili per ml. La stessa procedura va eseguita per il totale di motili + non motili.

Ad ogni sessione di raccolta del seme si sono ottenute le dimensioni testicolari utilizzando un calibro metallico di precisione, considerando per ogni testicolo lunghezza, larghezza e spessore.

2.6 Procedure di laboratorio

La determinazione del testosterone in questo studio è stata effettuata utilizzando un kit commerciale (LKPG1, Medical System, Genova, Italia) tramite il sistema automatizzato di immunodosaggio chemiluminescente DPC-Cirrus Immulite (Medical System). Il principio analitico della metodica si basa su un dosaggio immuno-enzimatico chemiluminescente competitivo in fase solida. Il metodo prevede l'utilizzo di biglie sensibilizzate con anticorpo policlonale di coniglio anti-testosterone e di un reagente contenente testosterone coniugato con fosfatasi alcalina. Il range di calibrazione della metodica è stato compreso tra 20 e 1600 ng/dL, con una sensibilità analitica di 15 ng/dL (Stelletta et al 2008).

2.7 Analisi statistica

L'analisi dei dati raccolti durante le tre prove iniziali che hanno considerato i livelli di testosteronemia (T0 e T60) e la temperatura scrotale è stata condotta tramite ANOVA per dati ripetuti considerando come fattori di variabilità il tempo e le singole prove.

L'analisi dei dati raccolti durante l'ultima serie di test con il GnRH che ha considerato i parametri flussimetrici e la testosteronemia ogni 10 minuti è stata

condotta tramite ANOVA per dati ripetuti considerando come fattori di variabilità il tempo.

Inoltre sono stati calcolati gli indici di correlazione di Pearson generali e per singoli soggetti per la totalità delle prove effettuate. Si è considerato infine l'analisi descrittiva dell'applicazione del protocollo su base individuale prendendo in considerazione tutti i parametri studiati.

CAPITOLO III - Risultati

La somministrazione di GnRH ha influenzato la temperatura scrotale e la testosteronemia durante il tempo di monitoraggio (60 minuti). Il confronto tra le temperature medie generali nei diversi tempi di monitoraggio e della testosteronemia media a T0 e T60 nelle diverse prove è riportato in tabella 2.

Tabella 2 – Variazioni della temperatura scrotale e testosteronemia durante i test del GnRH (T=temperatura, t=testosteronemia)

Tempo	1°test		2°test		3°test	
	T1	t1	T2	t2	T3	t3
0	30,79	101,52	30,09	151,34	30,27	67,64
5	29,46 ^a		30,97 ^b		29,62 ^{ac}	
10	29,13 ^a		30,80 ^b		29,35 ^{ac}	
15	29,08 ^a		30,70 ^b		29,54 ^{ac}	
20	28,87 ^a		30,49 ^b		29,72 ^{ac}	
25	28,70 ^a		30,62 ^b		29,42 ^c	
30	28,70 ^a		30,68 ^b		29,74 ^c	
35	28,46 ^a		30,60 ^b		29,25 ^{ac}	
40	28,28 ^a		30,57 ^b		29,19 ^{ac}	
45	28,62 ^a		30,31 ^b		29,41 ^{ac}	
50	28,46 ^a		30,03 ^b		29,25 ^b	
55	28,48 ^a		30,26 ^b		29,29 ^{ac}	
60	28,94 ^a	195,32	30,25 ^b	253,2	29,33 ^{ac}	308,2
S.E.M.	0,195		0,195		0,195	

Lettere diverse (a,b,c) in ogni colonna indicano una differenza significativa tra i test (P<0.05)

Nel primo e nel terzo test la temperatura superficiale scrotale ha iniziato a scendere dopo 5 minuti dalla somministrazione di GnRH, toccando un minimo tra i 30 e 40 minuti, per poi risalire, senza però ritornare la stessa di T0 entro i 60 minuti di svolgimento del test. Nel secondo test la temperatura a T60 è inferiore a quella a T0, ma l'abbassamento nei 60 minuti non è avvenuto in maniera omogenea.

Le variazioni di frequenza degli intervalli di temperatura sono riportate nei grafici 1, 2 e 3 per il primo, secondo e terzo test rispettivamente.

Grafico 1 - Distribuzione della frequenza degli intervalli di temperatura scrotale durante l'isolamento dalle femmine

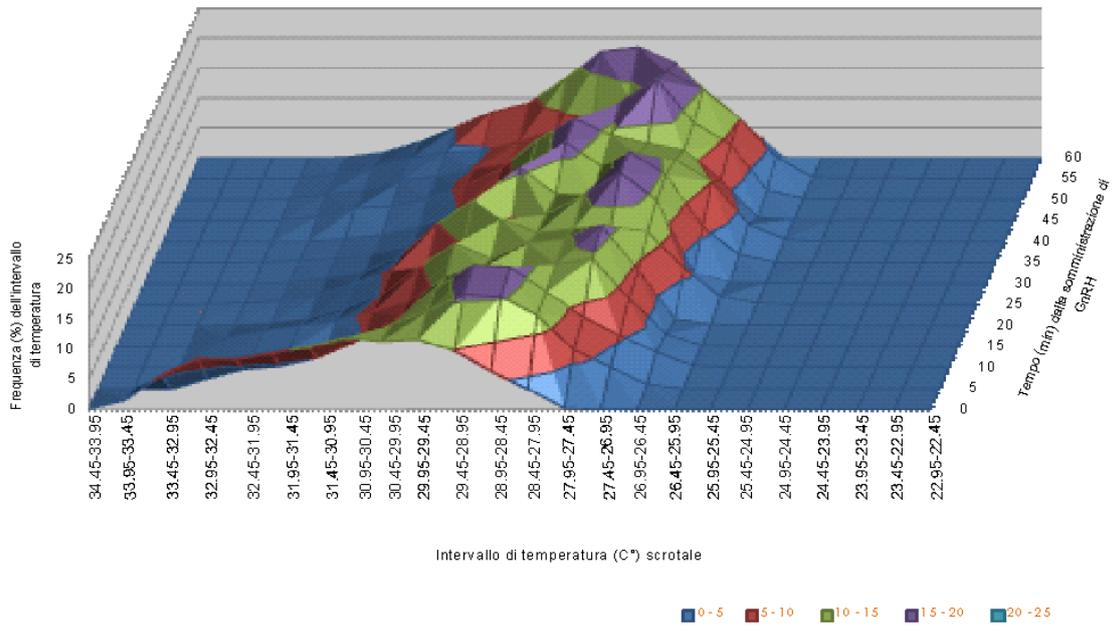


Grafico 2 - Distribuzione della frequenza degli intervalli di temperatura scrotale dopo l'esposizione alle femmine

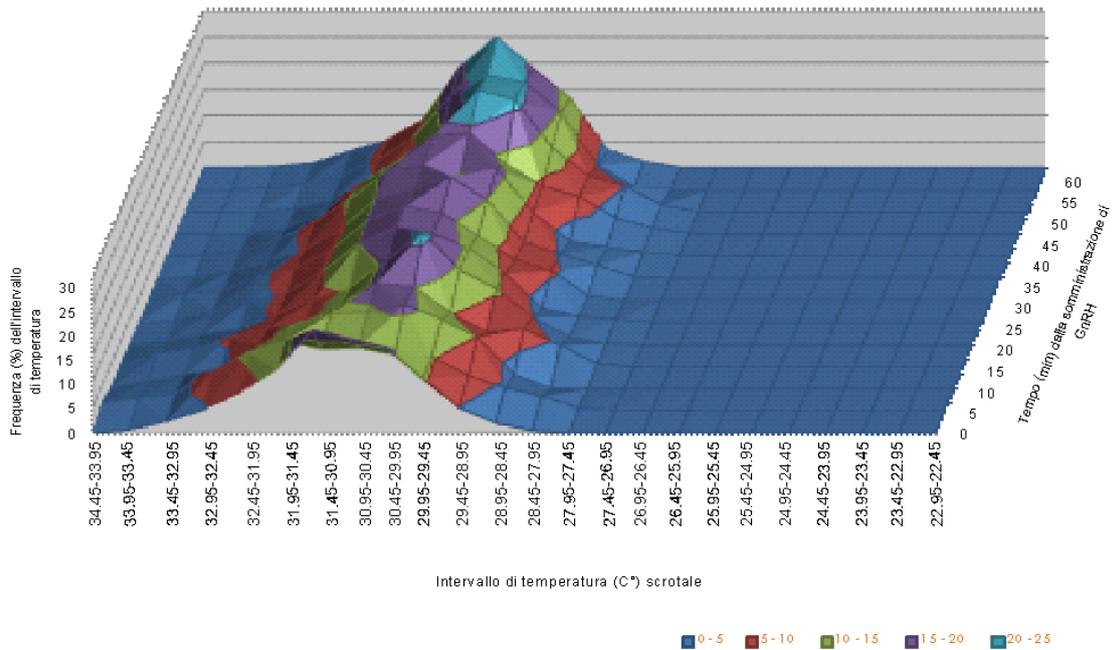
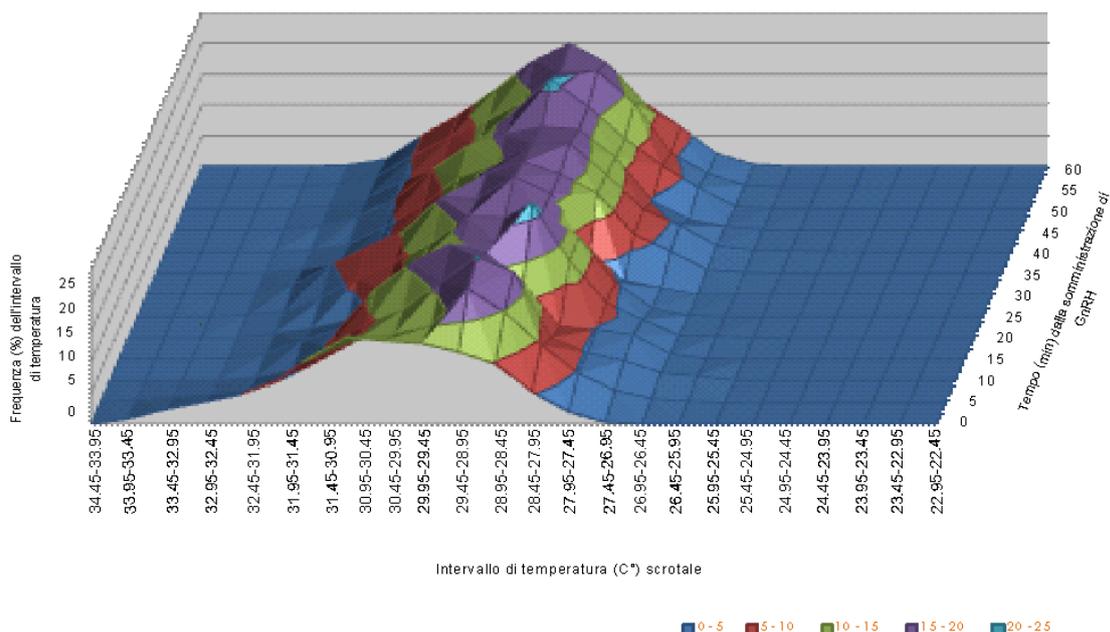


Grafico 3 - distribuzione della frequenza degli intervalli di temperatura scrotale dopo le monte



In generale si può affermare che la temperatura scrotale è diminuita durante il tempo di monitoraggio (60 minuti), con la variazione maggiore prima dell'esposizione alle femmine (grafico 4). La testosteronemia è aumentata durante il tempo di monitoraggio (grafico 5), con la variazione maggiore dopo le monte. I coefficienti di correlazione di Pearson sono stati 0.77, -0.638 e -0.378 ($P < 0.05$) rispettivamente per testosteronemia-tempo di monitoraggio, temperatura scrotale-tempo di monitoraggio e testosteronemia-temperatura scrotale. L'andamento della temperatura nei 60 minuti di monitoraggio e la variazione di testosteronemia tra T0 e T60 per i singoli animali sono riportati nelle tabelle 3, 4, 5, 6, 7. Da queste tabelle si nota una differenza individuale dei livelli basali e post-stimolazione della testosteronemia.

Grafico 4 – Variazione della temperatura scrotale nei tre test di stimolazione con il GnRH

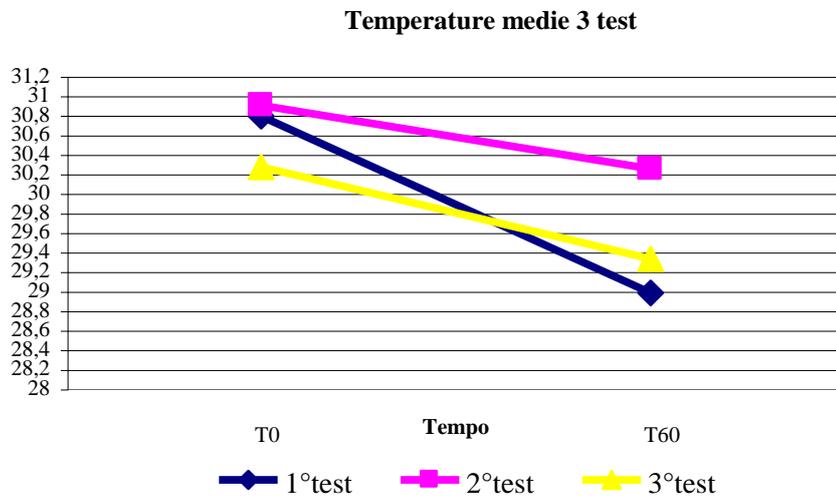


Grafico 5 – Variazione della testosteronemia nei tre test di stimolazione con il GnRH

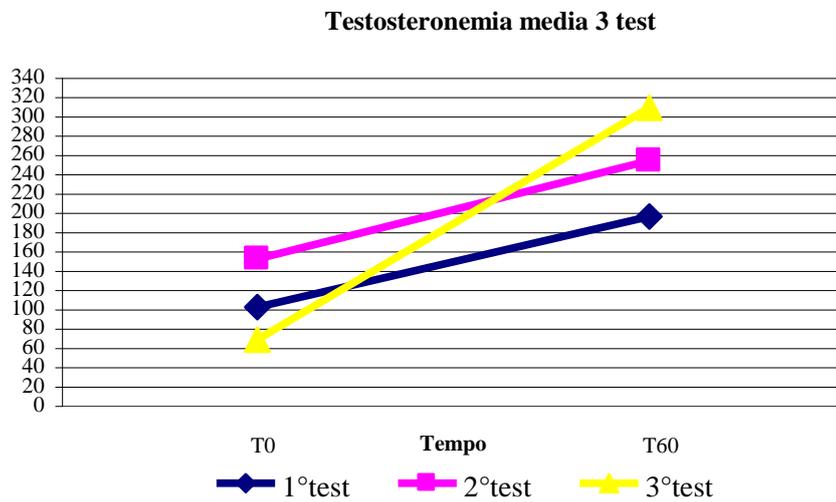


Tabella 3 - Variazioni della temperatura scrotale e testosteronemia durante i test del GnRH per l'animale 1 (T=temperatura, t=testosteronemia)

Tempo	1°test		2°test		3°test	
	T1	t1	T2	t2	T3	t3
0	30,00	96,9	31,55	78,8	31,00	69,5
5	29,25		30,90		30,80	
10	28,60		31,00		29,60	
15	28,80		31,65		29,10	
20	29,05		30,75		29,35	
25	29,55		31,80		29,40	
30	29,10		30,75		29,85	
35	28,35		31,05		29,50	
40	28,65		30,65		29,00	
45	28,65		30,55		29,30	
50	29,40		29,80		29,45	
55	29,35		30,20		29,45	
60	29,00	239	30,20	365	29,30	314

Tabella 4 - Variazioni della temperatura scrotale e testosteronemia durante i test del GnRH per l'animale 2 (T=temperatura, t=testosteronemia)

Tempo	1°test		2°test		3°test	
	T1	t1	T2	t2	T3	t3
0	31,15	118	30,70	93,9	30,35	65,9
5	29,45		31,45		30,15	
10	28,95		30,85		29,20	
15	28,00		29,90		30,10	
20	28,50		29,80		29,45	
25	27,45		29,95		29,10	
30	28,30		29,75		29,65	
35	27,40		30,45		28,80	
40	27,40		29,80		29,05	
45	28,20		29,75		29,35	
50	27,60		29,95		29,10	
55	27,80		30,25		29,30	
60	28,70	90,6	29,60	158	29,00	190

Tabella 5 - Variazioni della temperatura scrotale e testosteronemia durante i test del GnRH per l'animale 3 (T=temperatura, t=testosteronemia)

Tempo	1°test		2°test		3°test	
	T1	t1	T2	t2	T3	t3
0	31,70	146	31,35	192	31,15	54,2
5	30,50		32,45		29,70	
10	30,15		32,00		29,55	
15	29,85		31,80		30,20	
20	28,50		31,70		29,90	
25	28,25		31,45		29,90	
30	27,75		30,85		30,35	
35	28,10		31,05		29,65	
40	27,50		31,10		29,80	
45	27,95		30,80		30,00	
50	27,75		30,75		29,50	
55	27,40		30,20		29,30	
60	28,60	208	30,65	180	29,50	407

Tabella 6 - Variazioni della temperatura scrotale e testosteronemia durante i test del GnRH per l'animale 4 (T=temperatura, t=testosteronemia)

Tempo	1°test		2°test		3°test	
	T1	t1	T2	t2	T3	t3
0	30,10	53,1	30,60	251	29,40	49,8
5	28,70		29,70		28,25	
10	28,40		29,95		28,45	
15	28,90		29,70		28,75	
20	28,35		29,70		28,95	
25	28,60		30,15		29,45	
30	28,30		30,15		29,35	
35	29,00		29,95		28,80	
40	28,75		29,90		28,75	
45	29,00		29,65		28,90	
50	28,75		29,40		28,80	
55	28,85		30,20		29,00	
60	28,85	282	30,25	273	28,90	380

Tabella 7 - Variazioni della temperatura scrotale e testosteronemia durante i test del GnRH per l'animale 5 (T=temperatura, t=testosteronemia)

Tempo	1°test		2°test		3°test	
	T1	t1	T2	t2	T3	t3
0	31	93,6	30,30	141	29,45	98,8
5	29,4		30,35		29,20	
10	29,55		30,20		29,95	
15	29,85		30,45		29,55	
20	29,95		30,50		29,15	
25	29,65		30,80		29,25	
30	30,05		30,85		29,50	
35	29,45		30,5		29,5	
40	29,1		31,4		29,35	
45	29,3		30,8		29,5	
50	-		30,25		29,4	
55	-		30,45		29,4	
60	-	157	30,55	290	29,95	250

Il rilevamento dell'intensità ecografica testicolare ha rivelato un valore medio generale di $-74,7$ dB (decibels). Per il testicolo destro la media generale è di $-74,8$ dB e per il sinistro di $-74,7$ dB. Considerando i singoli animali, il range di valori medi per soggetto va da $-72,4$ a $-76,8$ dB, corrispondenti al valore medio rispettivamente dell'animale 5 e dell'animale 1. Nell'effettuare la misurazione l'area di parenchima testicolare più vicina alla sonda ha dimostrato di avere una intensità ecografica media di $-79,4$ dB, mentre l'area più distante dalla sonda di -70 dB.

Tabella 8 – Valori medi di intensità ecografica testicolare (in decibels) per i cinque animali

	Animale 1	Animale 2	Animale 3	Animale 4	Animale 5
Media	$-76,8 \pm 6,6$	$-75,7 \pm 4,8$	$-75,8 \pm 4,4$	$-73,0 \pm 5,8$	$-72,4 \pm 6,9$
Media test dx	$-75,6 \pm 6,7$	$-76,1 \pm 5,2$	$-76,7 \pm 4,9$	$-73,3 \pm 5,8$	$-72,4 \pm 7,8$
Media test sx	$-77,9 \pm 6,7$	$-75,4 \pm 4,7$	$-74,8 \pm 4,0$	$-72,7 \pm 6,2$	$-72,5 \pm 6,5$
Media generale	$-74,7 \pm 5,9$				

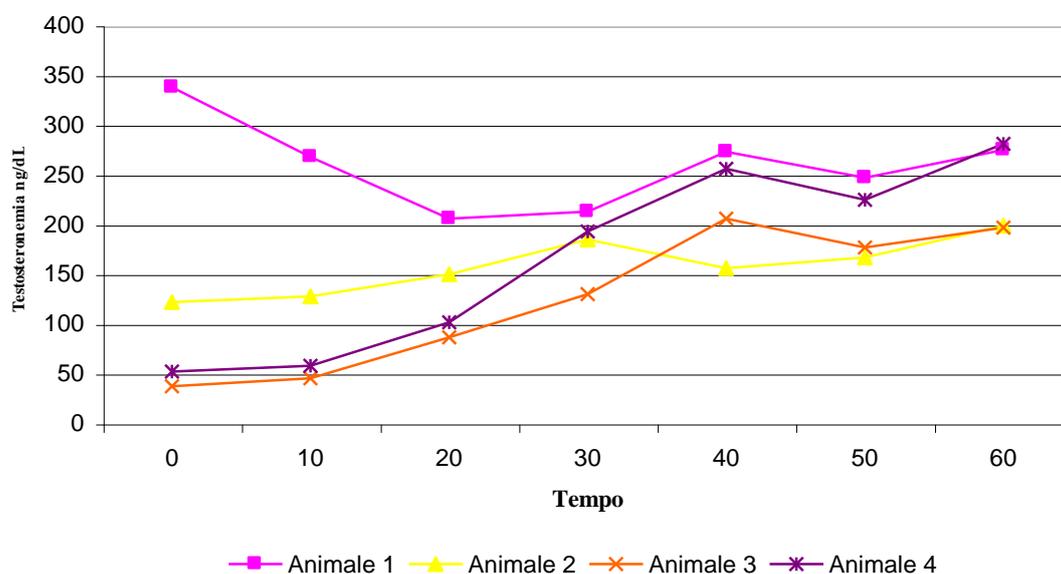
I dati riguardanti la testosteronemia ottenuti durante il test del GnRH condotto per lo studio della flussimetria confermano quanto già ottenuto riguardo a questo parametro durante le prove di termografia, ossia che c'è un aumento dei livelli circolanti di testosterone in seguito alla stimolazione con GnRH.

Tabella 9 - Valori medi generali di testosteronemia (ng/dL) durante il test del GnRH

Tempo	Testosteronemia
0	137,53
10	124,95
20	136,23
30	180,25
40	222,75
50	204,00
60	238,00

Avendo ottenuto, però, un campione di sangue ogni dieci minuti da T0 a T60 è stato possibile osservare l'andamento completo dei livelli ematici di testosterone durante il test del GnRH. In particolare, si nota un picco della testosteronemia a T40, con un successivo abbassamento a T50 e poi un rialzamento a T60. Esistono tuttavia differenze individuali negli animali studiati. L'animale 1 parte da un livello di testosteronemia superiore rispetto agli altri tre soggetti; questo valore scende fino a T20 per poi rialzarsi con un picco a T40. L'animale 2, invece, presenta un picco a T30 e non a T40. Il valore di testosteronemia basale elevato dell'animale 1 è responsabile di un valore medio più elevato a T0 rispetto a T10, come si può vedere in tabella 9. Nonostante queste differenze, si può affermare che l'andamento della curva della testosteronemia in seguito alla stimolazione con GnRH presenta lo stesso tipo di pattern in tutti e quattro i soggetti (grafico 6)

Grafico 6 - Variazione della testosteronemia durante il test del GnRH



I valori medi generali dei diversi parametri considerati nello studio della flussimetria sono riportati in tabella 10.

Tabella 10 - Valori medi generali dei diversi parametri flussimetrici durante il test del GnRH

Tempo	VS	VD	PI	RI
0	10,75	4,22	1,09	0,57
10	11,20	4,56	1,06	0,60
20	11,57	4,02	1,38	0,63
30	10,32	4,11	1,04	0,60
40	12,30	5,26	1,24	0,56
50	9,76	4,25	1,02	0,56
60	11,89	4,87	1,15	0,58
S.E.M.	1	0,48	0,01	0,05

I rilievi flussimetrici rivelano una variazione dei parametri considerati durante il tempo di monitoraggio di 60 minuti in seguito a stimolazione con il GnRH. L'andamento dei vari parametri nel tempo presenta un pattern individuale che differisce tra i vari soggetti. Si può affermare che negli animali 1, 2 e 3

l'andamento della velocità sistolica rispecchia quello dell'indice di pulsatilità. Nell'animale 4 questo non avviene. In tutti e 4 gli animali l'andamento dell'indice di pulsatilità rispecchia quello dell'indice di resistività. L'andamento della velocità diastolica nei diversi soggetti non segue in maniera uniforme quello degli altri parametri, anche se non differisce completamente da questi, come si può osservare nei grafici riportati nelle schede di valutazione della funzionalità testicolare costruite per ogni soggetto. Dagli stessi grafici si nota che i valori minimi dei diversi parametri si riscontrano in tempi diversi per i diversi animali. Nonostante ciò, si può vedere come la diminuzione dei valori di velocità sistolica, indice di pulsatilità e indice di resistività avvenga nell'intervallo di tempo compreso tra T20 e T50, ad eccezione dell'animale 2, dove si riscontrano i valori minimi di questi parametri già a 10 minuti dalla somministrazione di GnRH. Si nota, inoltre, come ci sia una corrispondenza tra aumento della testosteronemia aumento della velocità diastolica. Considerando i valori medi di tutti gli animali, non esiste una correlazione positiva significativa tra questi due parametri, forse per la notevole intervariabilità individuale

Esistono alcune differenze significative tra i diversi animali per i vari parametri flussimetrici nei diversi tempi di monitoraggio (T0 a T60). Tali differenze sono riportate nelle tabelle 11, 12, 13, 14. L'unico parametro per cui quasi non esistono differenze è la velocità sistolica. Si nota come l'animale che presenta maggiori differenze con gli altri soggetti è l'animale 2. L'animale 4 presenta alcune differenze con gli altri per quanto riguarda la velocità sistolica e l'indice di resistività.

Tabella 11 - Variazione della velocità sistolica durante il test del GnRH

Tempo	Animale 1	Animale 2	Animale 3	Animale 4
0	6,57 ^a	15,10 ^b	8,78 ^{ac}	12,55 ^{bc}
10	9,25 ^{ab}	7,24 ^b	14,19 ^a	14,14 ^a
20	8,55 ^a	14,73 ^b	12,07 ^{ab}	10,96 ^{ab}
30	6,73 ^a	10,40 ^{ab}	9,08 ^a	15,08 ^b
40	6,73 ^a	11,37 ^{ab}	15,52 ^b	10,03 ^a
50	7,39	9,29	11,54	10,84
60	8,43 ^a	14,61 ^{bc}	8,97 ^a	15,54 ^{bc}
S.E.M.	1,19			

Lettere diverse (a,b,c) in ogni colonna indicano una differenza significativa tra gli animali (P<0.05)

Tabella 12 - Variazione della velocità diastolica durante il test del GnRH

Tempo	Animale 1	Animale 2	Animale 3	Animale 4
0	3,77	3,56	4,12	5,44
10	3,97	2,61	4,24	7,42
20	4,16	2,32	3,69	5,91
30	3,57	2,70	4,04	6,14
40	3,57	2,52	6,50	6,76
50	3,97	2,17	6,33	4,55
60	3,96 ^{ab}	2,76 ^a	3,69 ^a	9,06 ^b
S.E.M.	0,64			

Lettere diverse (a,b) in ogni colonna indicano una differenza significativa tra i test (P<0.05)

Tabella 13 - Variazione dell'indice di pulsatilità durante il test del GnRH

Tempo	Animale 1	Animale 2	Animale 3	Animale 4
0	0,56 ^a	1,78 ^b	0,99 ^{ab}	1,02 ^{ab}
10	0,85	1,20	1,47	0,74
20	0,79 ^a	2,54 ^b	1,41 ^a	0,77 ^a
30	0,49 ^a	1,73 ^b	1,02 ^{ab}	0,95 ^{ab}
40	0,49 ^a	1,91 ^b	1,23 ^{ab}	0,59 ^a
50	0,75 ^a	1,73 ^b	0,74 ^a	0,89 ^a
60	0,95 ^a	2,09 ^b	1,02 ^a	0,55 ^a
S.E.M.	0,18			

Lettere diverse (a,b) in ogni colonna indicano una differenza significativa tra i test (P<0.05)

Tabella 14 - Variazione dell'indice di resistività durante il test del GnRH

Tempo	Animale 1	Animale 2	Animale 3	Animale 4
0	0,44 ^a	0,77 ^b	0,54 ^{ab}	0,55 ^{ab}
10	0,57	0,64	0,72	0,49
20	0,5 ^a	0,85 ^b	0,7 ^{ab}	0,46 ^a
30	0,47	0,75	0,58	0,60
40	0,47 ^{ab}	0,77 ^a	0,58 ^{ab}	0,35 ^b
50	0,46 ^{ab}	0,77 ^a	0,42 ^b	0,58 ^{ab}
60	0,53 ^{ab}	0,82 ^a	0,57 ^{ab}	0,40 ^b
S.E.M.	0,05			

Lettere diverse (a,b) in ogni colonna indicano una differenza significativa tra i test (P<0.05)

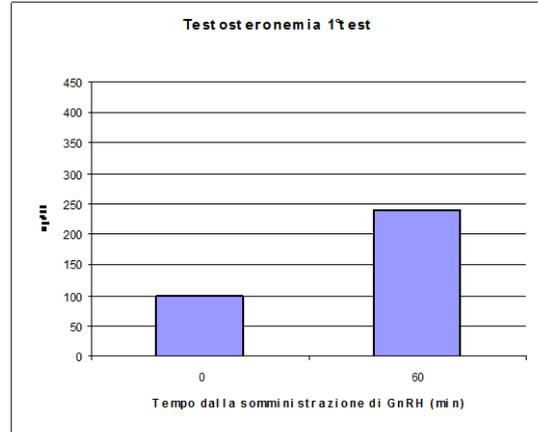
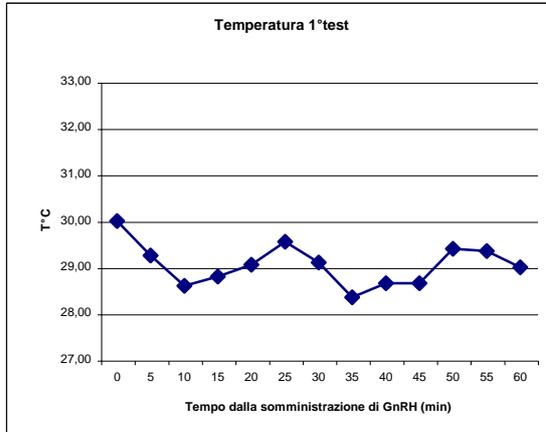
Considerando le medie generali dei diversi parametri, esiste una correlazione positiva significativa per testosterone-tempo (come già riscontrato durante il monitoraggio termografico). Si è invece riscontrata una correlazione negativa significativa per testosterone-RI (-0,301).

Nelle pagine che seguono sono riportate le schede di valutazione della funzionalità testicolare, che riportano in maniera individuale i dati ottenuti durante il test del GnRH riguardanti temperatura, testosterone e flussimetria, complementate dai parametri di qualità seminale e dalle dimensioni testicolari.

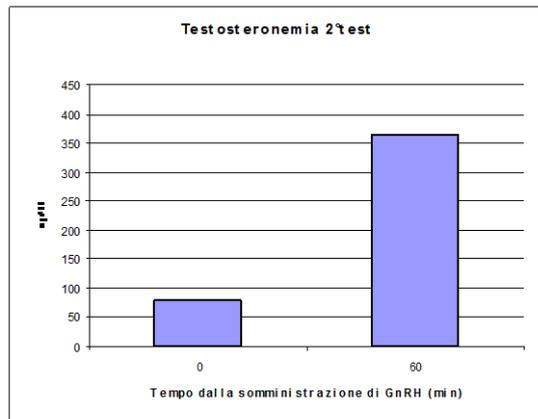
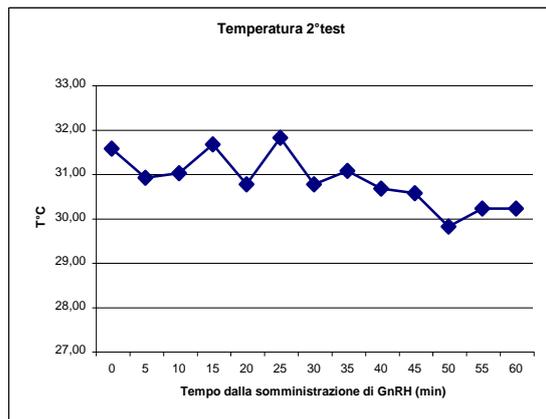
SCHEDA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE

ALPACA 1

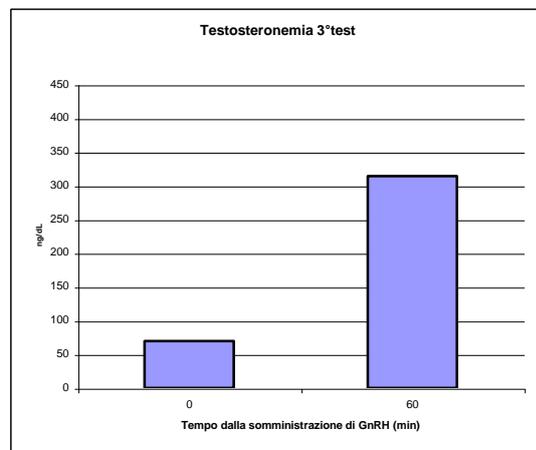
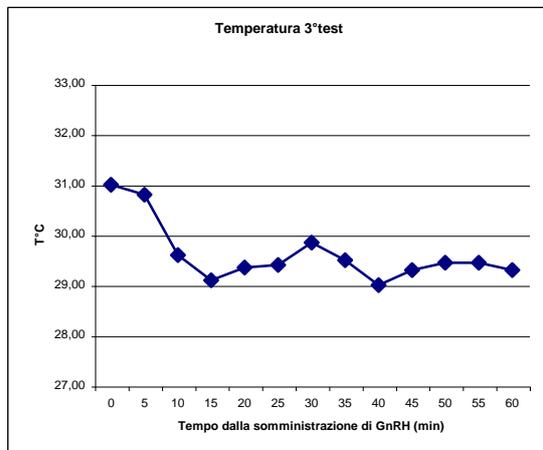
ISOLAMENTO DALLE FEMMINE



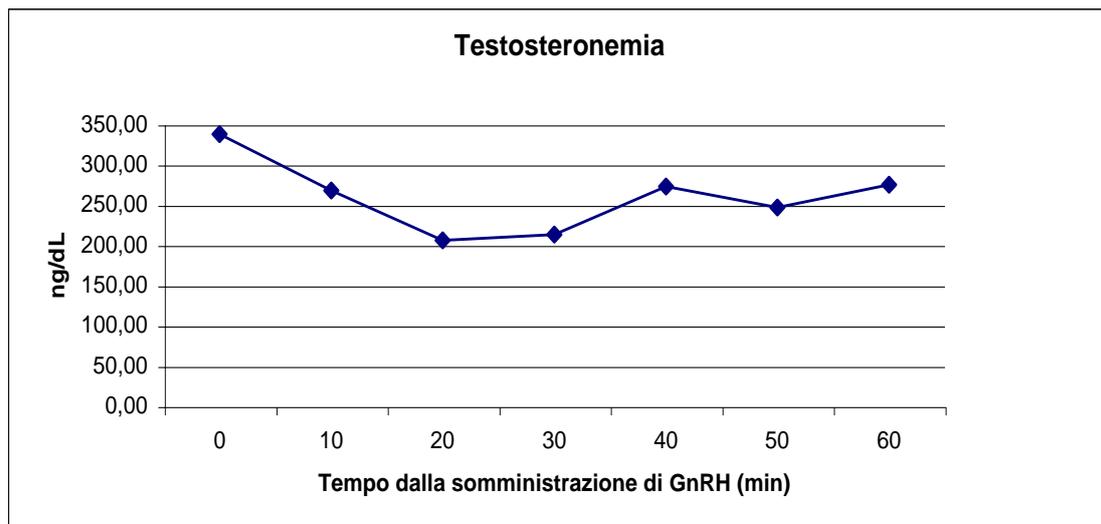
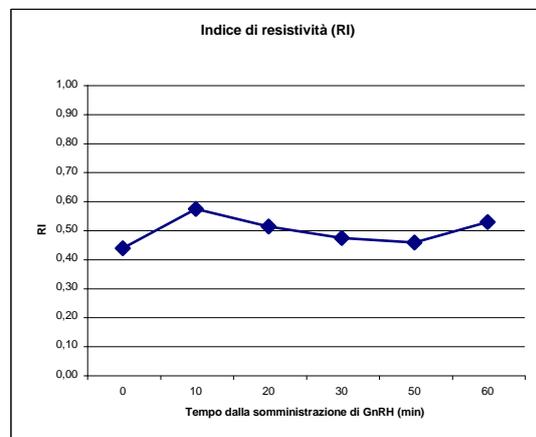
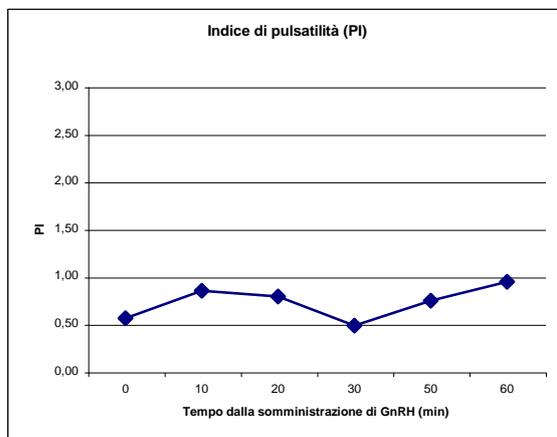
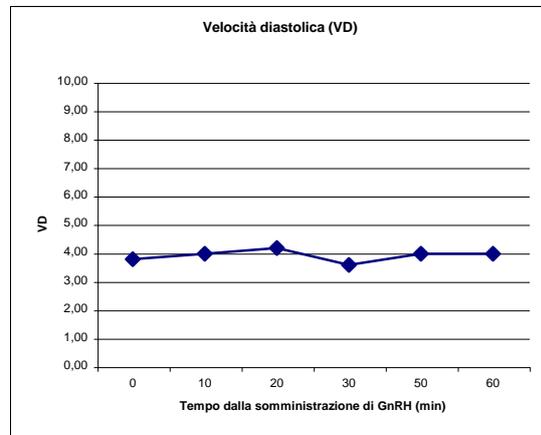
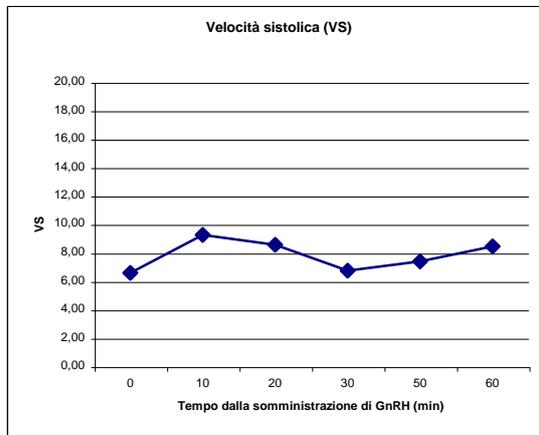
ESPOSIZIONE ALLE FEMMINE



PERIODO DI MONTA



PARAMETRI FLUSSIMETRICI E TESTOSTERONEMIA



PARAMETRI DI QUALITÀ SEMINALE E DIMENSIONI TESTICOLARI

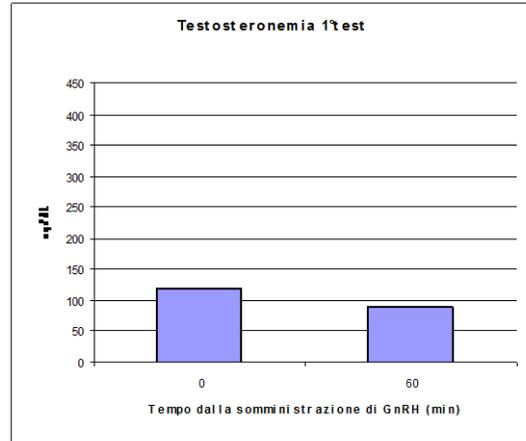
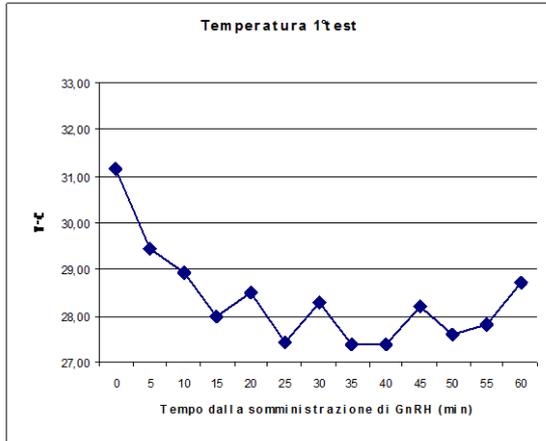
	Viscosità	Vol.(ml)	Motilità %	CON.(x10 ⁶ spz/ml)	Testicolo dx			Testicolo sx		
					Lunghezza	Larghezza	Spessore	Lunghezza	Larghezza	Spessore
2009	2,7±0,6	4,6±3,0	26,0±23,7	38,9±72,9	4,1±0,4	2,6±0,3	2,2±0,2	3,9±0,5	2,6±0,3	2,2±0,2
2010	3,0±0,0	4,5±1,9	12,0±17,9	28,8±62,2	3,7±0,6	2,6±0,3	2,0±0,2	3,4±0,9	2,3±0,6	2,1±0,4

Nota: 2009 = marzo – agosto
2010 = marzo – giugno

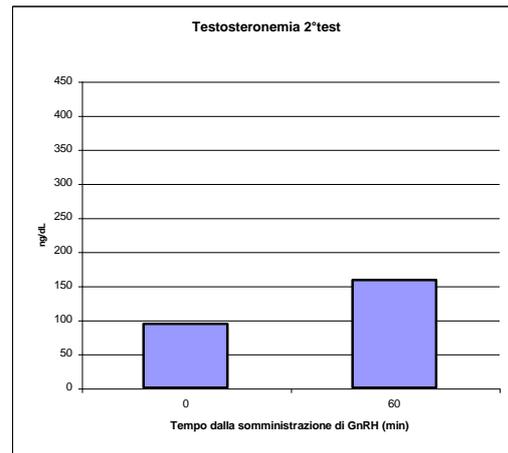
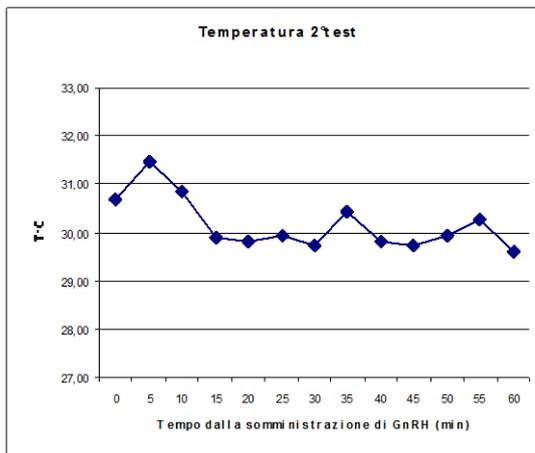
SCHEDA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE

ALPACA 2

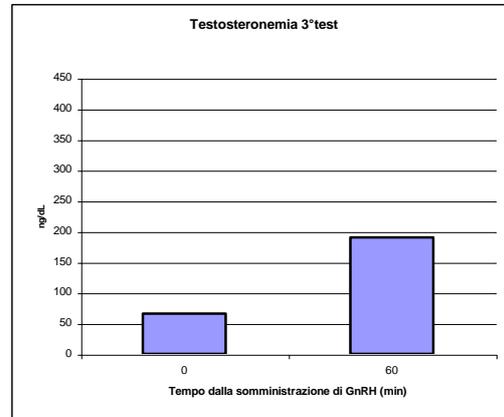
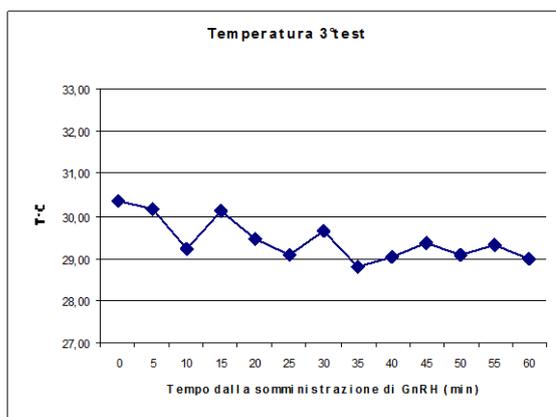
ISOLAMENTO DALLE FEMMINE



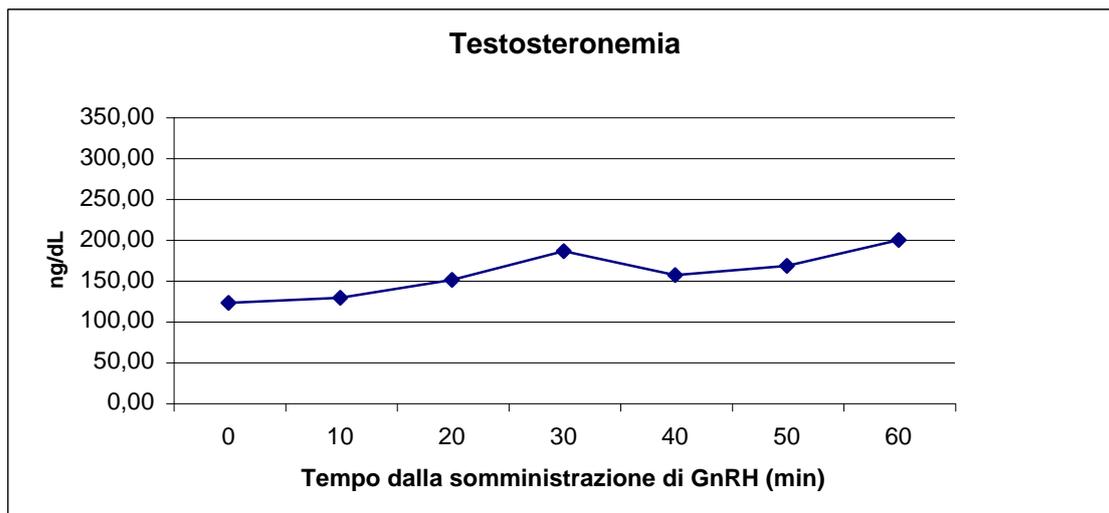
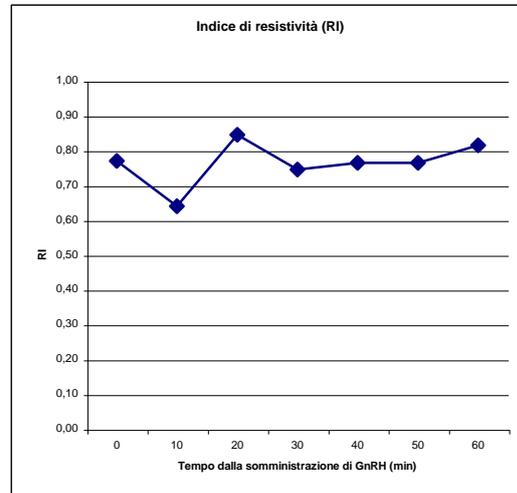
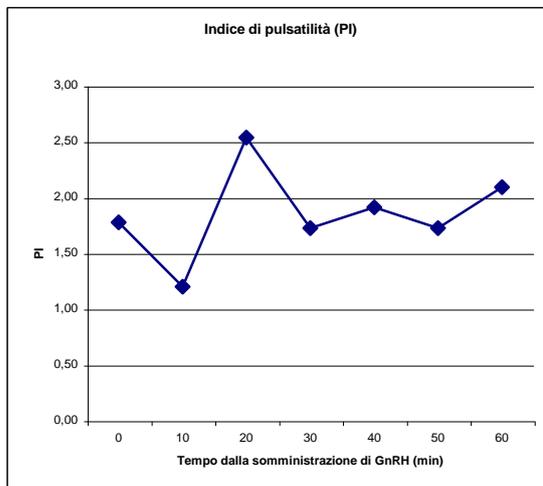
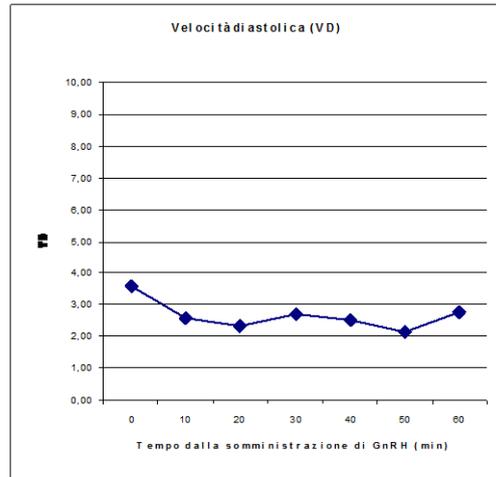
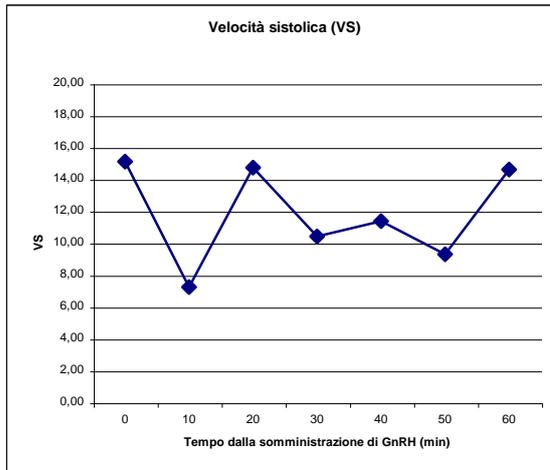
ESPOSIZIONE ALLE FEMMINE



PERIODO DI MONTA



PARAMETRI FLUSSIMETRICI E TESTOSTERONEMIA



PARAMETRI DI QUALITÀ SEMINALE E DIMENSIONI TESTICOLARI

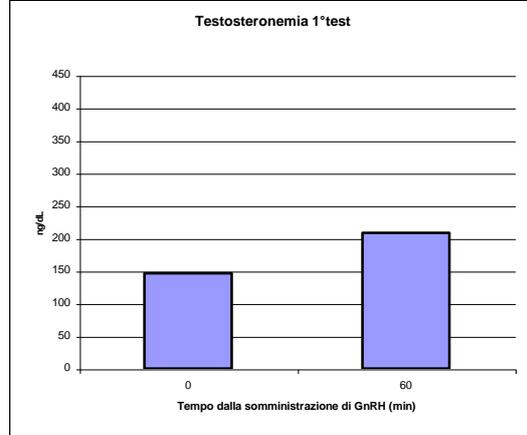
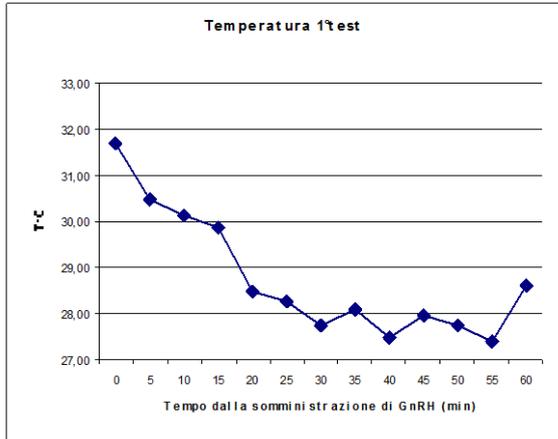
	Viscosità	Vol.(ml)	Motilità %	CON.(x10 ⁶ spz/ml)	Testicolo dx			Testicolo sx		
					Lunghezza	Larghezza	Spessore	Lunghezza	Larghezza	Spessore
2009	1,1±0,3	1,8±0,7	67,8±17,7	122,8±113,2	3,9±0,4	2,4±0,3	2,1±0,3	3,7±0,4	2,3±0,3	2,0±0,3
2010	1,0±0	1,9±0,4	72,2±14,8	88,6±31,5	3,9±0,6	2,0±0,5	2,0±0,1	3,5±0,4	2,2±0,4	1,9±0,2

Nota: 2009 = marzo – agosto
 2010 = marzo – giugno

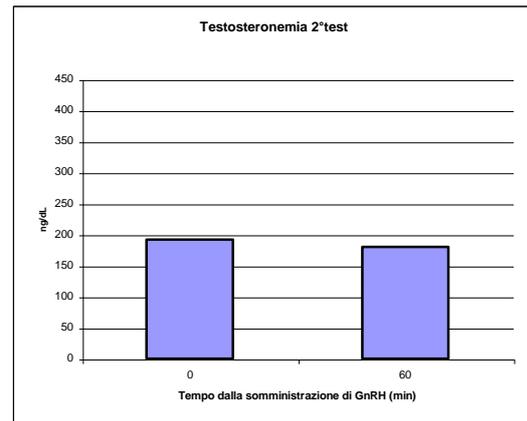
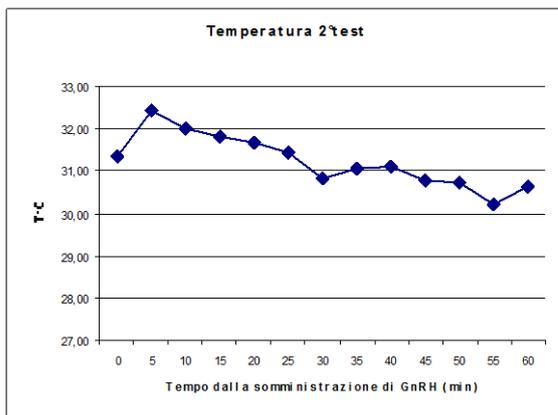
SCHEDA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE

ALPACA 3

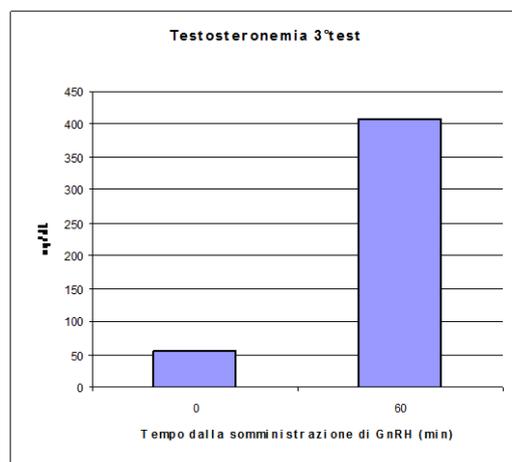
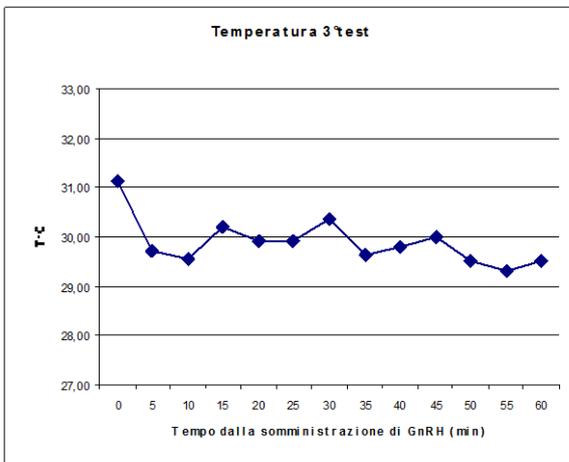
ISOLAMENTO DALLE FEMMINE



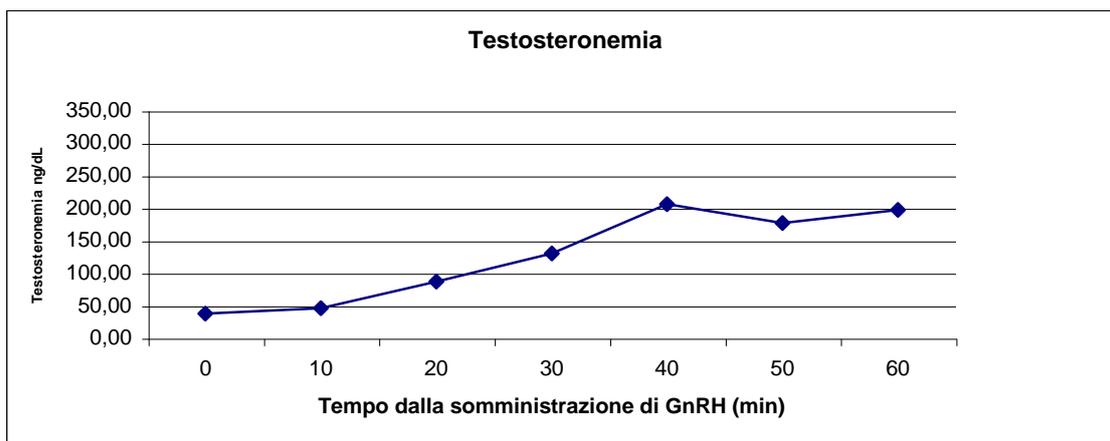
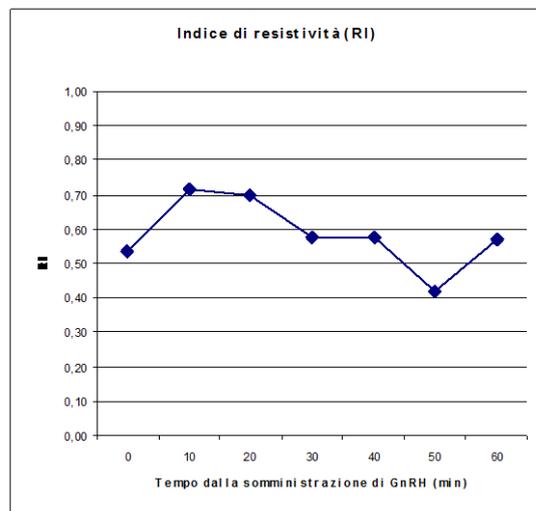
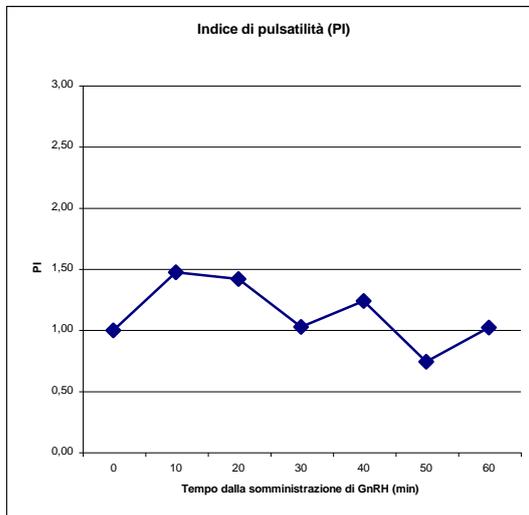
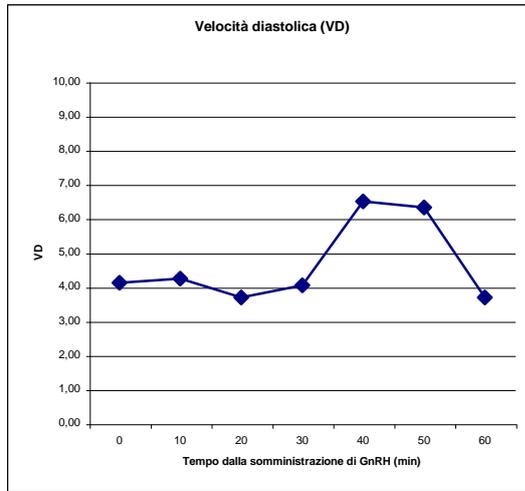
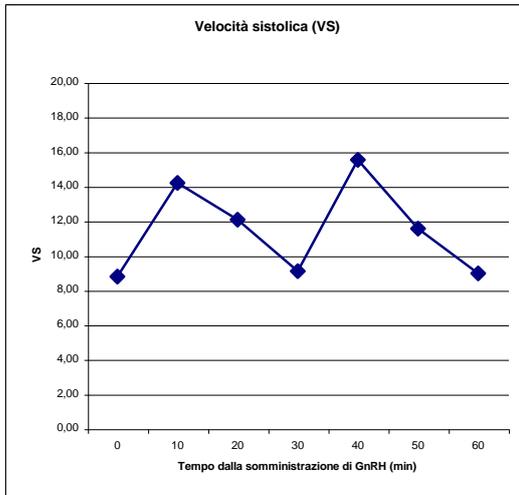
ESPOSIZIONE ALLE FEMMINE



PERIODO DI MONTA



PARAMETRI FLUSSIMETRICI E TESTOSTERONEMIA



PARAMETRI DI QUALITÀ SEMINALE E DIMENSIONI TESTICOLARI

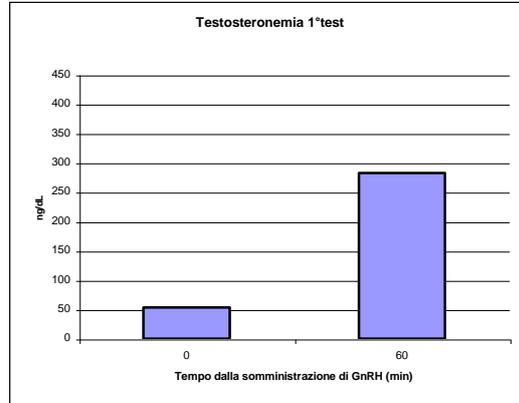
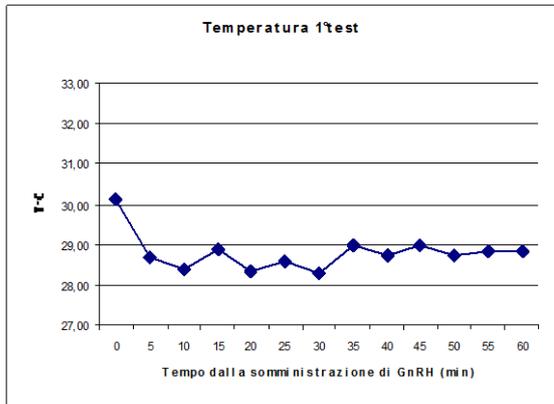
	Viscosità	Vol.(ml)	Motilità %	CON.(x10 ⁶ spz/ml)	Testicolo dx			Testicolo sx		
					Lunghezza	Larghezza	Spessore	Lunghezza	Larghezza	Spessore
2009	2,1±0,6	2,1±1,0	2,6±5,7	8,1±11,1	4,5±0,3	2,9±0,4	2,5±0,3	4,4±0,5	2,8±0,3	2,5±0,4
2010	2,0±0	4,5±0	20,0±0	0,2±0	4,0±0,7	2,3±0,4	2,0±0,5	4,0±0,6	2,5±0,6	2,4±0,3

Nota: 2009 = marzo – agosto
 2010 = marzo – giugno

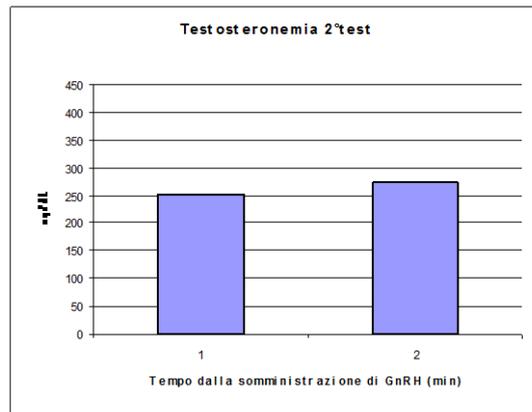
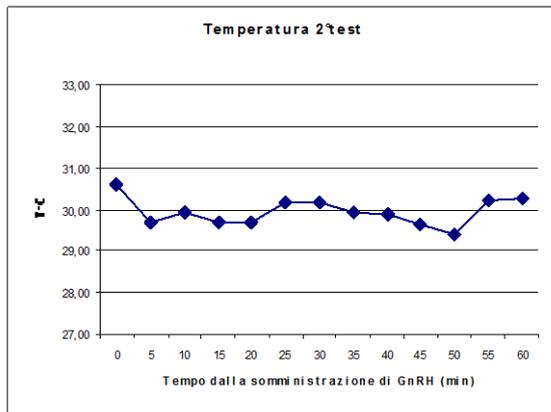
SCHEDA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE

ALPACA 4

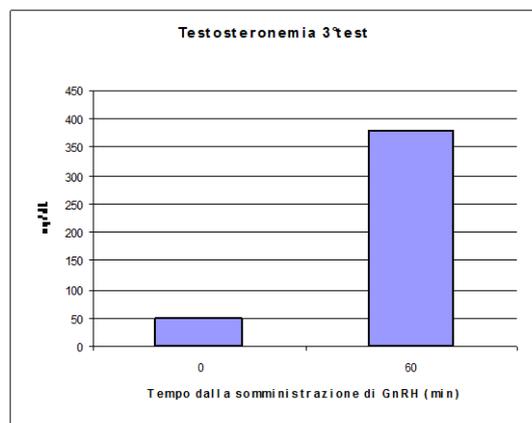
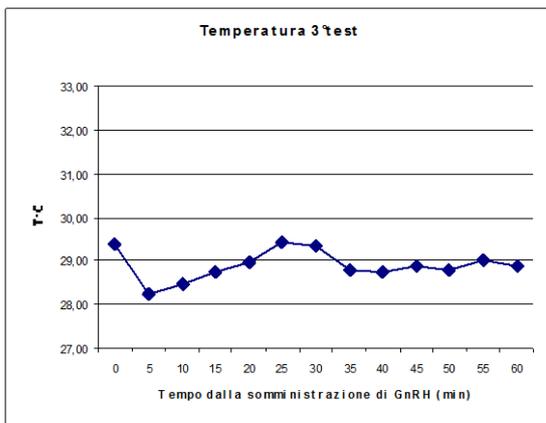
ISOLAMENTO DALLE FEMMINE



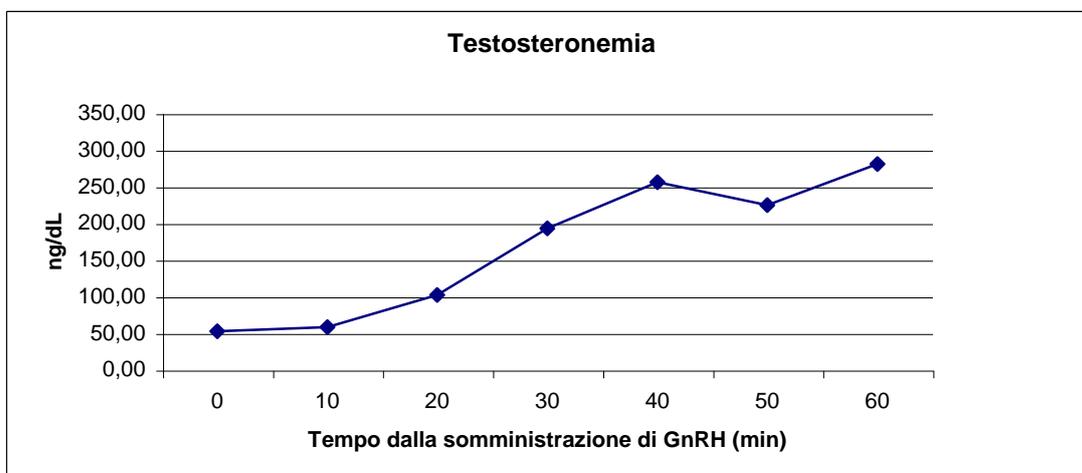
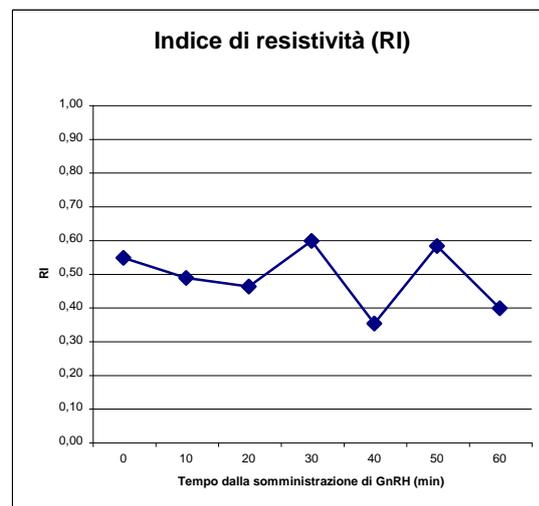
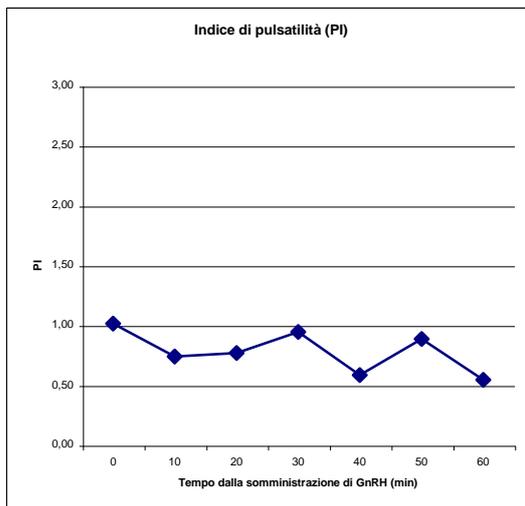
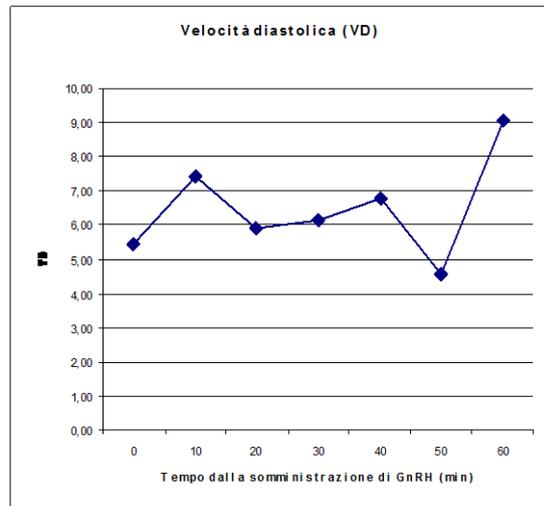
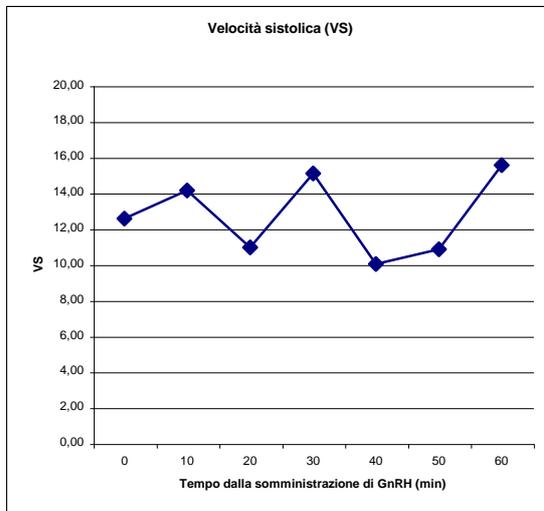
ESPOSIZIONE ALLE FEMMINE



PERIODO DI MONTA



PARAMETRI FLUSSIMETRICI E TESTOSTERONEMIA



PARAMETRI DI QUALITÀ SEMINALE E DIMENSIONI TESTICOLARI

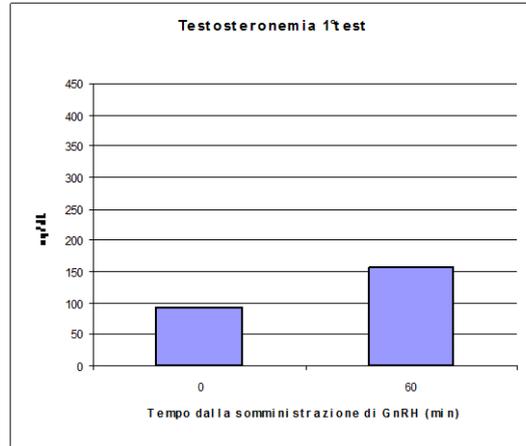
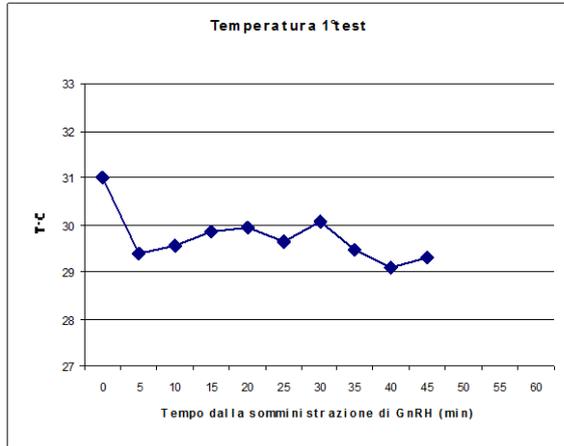
	Viscosità	Vol.(ml)	Motilità %	CON.(x10 ⁶ spz/ml)	Testicolo dx			Testicolo sx		
					Lunghezza	Larghezza	Spessore	Lunghezza	Larghezza	Spessore
2009	2,2±0,5	3,4±3,5	24,7±23,0	61,5±81,7	4,5±0,3	2,9±0,4	2,4±0,3	4,5±0,6	3,1±0,4	2,6±0,3
2010	2,3±0,5	2,7±0,4	21,2±17,6	113,6±63,0	4,3±1,1	2,6±0,3	2,0±0,4	4,7±1,3	2,8±0,3	2,5±0,4

Nota: 2009 = marzo – agosto
 2010 = marzo – giugno

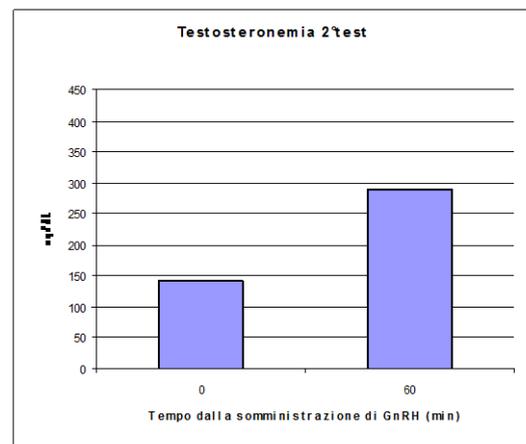
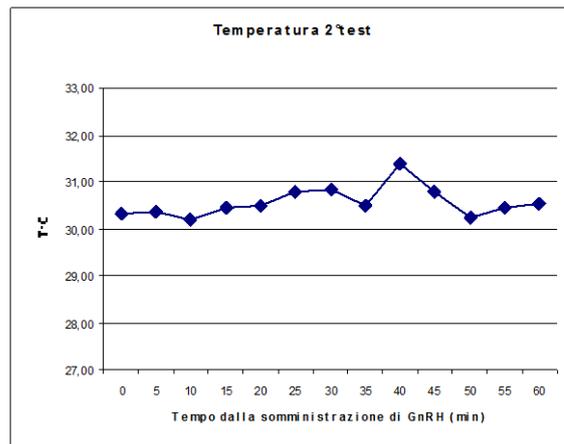
SCHEDA DI VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ TESTICOLARE

ALPACA 5

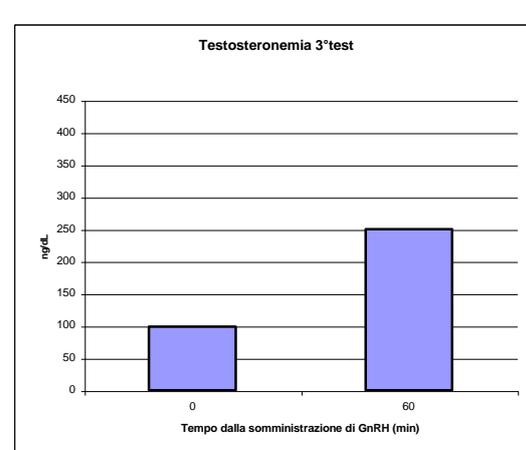
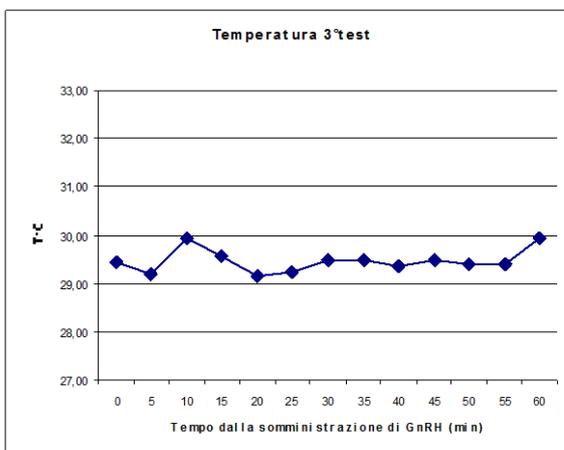
ISOLAMENTO DALLE FEMMINE



ESPOSIZIONE ALLE FEMMINE



PERIODO DI MONTA



PARAMETRI DI QUALITÀ SEMINALE E DIMENSIONI TESTICOLARI

	Viscosità	Vol.(ml)	Motilità %	CON.(x10 ⁶ spz/ml)	Testicolo dx			Testicolo sx		
					Lunghezza	Larghezza	Spessore	Lunghezza	Larghezza	Spessore
2009	1,4±0,7	2,1±1,1	0,0±0,0	0,0±0,0	4,3±0,3	2,6±0,2	2,1±0,2	4,0±0,3	2,5±0,3	2,1±0,2
2010					4,3±0,4	2,3±0,4	2,0±0,3	4,1±0,3	2,3±0,3	1,9±0,5

Nota: 2009 = marzo – agosto
 2010 = marzo – giugno

CAPITOLO IV – Discussione e Conclusione

4.1 Discussione

Dai risultati ottenuti durante i test del GnRH in questo studio si può affermare che esiste una risposta del testicolo alla stimolazione con quest'ormone. I rilievi termografici eseguiti in concomitanza con il test del GnRH hanno rivelato una diminuzione della temperatura scrotale in seguito a somministrazione per via endovenosa di un analogo del GnRH (Buserelin). Tale diminuzione è iniziata 5 minuti dopo la somministrazione dell'ormone. Questi risultati differiscono da quanto ottenuto in altri lavori effettuati sulla specie bovina, nei quali la stimolazione con GnRH ha provocato un aumento della temperatura scrotale, con una maggior variazione nella porzione inferiore del testicolo (Gabor et al 1998). In altri studi eseguiti sul toro (Cook et al 1994) è stato dimostrato che lo scroto (dopo rimozione del testicolo) ha un gradiente di temperatura positivo e che il testicolo (senza lo scroto) ha un gradiente di temperatura negativo. Questi gradienti di temperatura sembrano complementarsi l'un l'altro risultando in una temperatura intratesticolare relativamente uniforme (inferiore a quella corporea) (Kastelic et al 1997). Questi gradienti potrebbero essere dovuti alla disposizione della vascolarizzazione testicolare (Kastelic et al 1995). Lo scroto è apparentemente vascolarizzato dalla porzione superiore verso quella inferiore; l'arteria testicolare si dirige verso il polo ventrale per poi divergere in diverse ramificazioni che si distribuiscono dorsalmente e lateralmente sulla superficie del testicolo prima di entrare nel parenchima (Kastelic et al 1997). Tenendo presente queste informazioni, la diminuzione e non un aumento nella temperatura scrotale durante il test del GnRH negli alpaca potrebbe essere dovuta alla diversa disposizione anatomica del testicolo di questa specie rispetto a quello del toro.

La maggior variazione della temperatura scrotale tra T0 (pre GnRH) e T60 (post GnRH) è avvenuta prima dell'esposizione alle femmine. La stabilità della temperatura scrotale dopo l'esposizione alle femmine potrebbe essere relazionata ad un'attivazione dei meccanismi di controllo ormonale locale dei testicoli. In questo senso, si può pensare ad una relazione tra l'attivazione di questi

meccanismi e l'aumento della testosteronemia post GnRH riscontrato nei 3 test di monitoraggio della temperatura scrotale. Tenendo in considerazione che quest'aumento è maggiore nella terza prova (dopo le monte) e che in questa prova c'è il minor gradiente di temperatura, si potrebbe dedurre che ad un aumento della testosteronemia corrisponde una minor capacità di termoregolazione testicolare. Inoltre, c'è una corrispondenza tra il picco di testosteronemia che avviene 40 minuti dopo la stimolazione con il GnRH e le temperature minime registrate durante il monitoraggio termografico.

I valori rilevati per parametri flussimetrici sono in linea con i valori per gli stessi parametri valutati nello stallone (Zelli et al. 2007). Considerando l'andamento dei vari parametri presi in questione si potrebbe pensare ad una relazione tra diminuzione della temperatura e diminuzione del flusso sanguigno a livello locale. Nonostante la differenza individuale del pattern di variazione di questi parametri, si nota come i valori minimi siano più o meno in corrispondenza con i valori massimi di testosteronemia (quindi valori minimi di temperatura), o comunque associati ad un aumento di quest'ultima. A sostegno di questo fatto è la correlazione negativa significativa tra testosteronemia e RI. Questa risposta di diminuzione del flusso presenta una variazione individuale ed avviene in tempi diversi per i diversi soggetti. Ad esempio, nell'animale 4 i valori minimi dei parametri flussimetrici si riscontrano in perfetta corrispondenza del picco di testosteronemia, ossia a 40 minuti dalla somministrazione di GnRH. Nell'animale 3 la velocità sistolica è minima prima del picco di testosteronemia, mentre indice di pulsatilità e indice di resistività sono minimi dopo il picco. Negli animali 1 e 2 la diminuzione dei parametri avviene prima del picco. In particolare, nell'animale 2 i valori minimi di velocità sistolica, indice di pulsatilità e indice di resistività si riscontrano a soli 10 minuti dalla somministrazione di GnRH e 20 minuti prima del picco di testosteronemia, che a differenza degli altri soggetti è a 30 minuti e non a 40 dalla somministrazione. Da ciò, si può dedurre che l'animale 2 risponde con una variazione del flusso sanguigno locale alla stimolazione con GnRH in maniera più immediata rispetto agli altri. Inoltre, è soprattutto l'animale 2 che presenta il maggior numero di differenze significative dagli altri per i parametri flussimetrici durante i 60 minuti

di monitoraggio. Considerando i parametri di qualità seminale, si può affermare che questa maggior capacità di risposta del testicolo alla stimolazione della sua funzionalità è correlata con un miglior seme. L'animale 5 non ha mai prodotto spermatozoi nell'eiaculato, così da poter essere considerato azoospermico. È interessante notare come l'intensità ecografica dei testicoli di questo animale sia superiore rispetto agli altri. La mancanza di dati riguardanti la flussimetria per questo soggetto non permette, purtroppo, di valutare quest'aspetto, ma dal monitoraggio termografico effettuato durante il terzo test di stimolazione con il GnRH (dopo le monte), si vede che è questo l'animale che presenta una minor variazione di temperatura tra prima e dopo la somministrazione, e quindi dimostra una minor capacità di termoregolazione. Si può, quindi, pensare che anche questo sia associato ad una qualità seminale inferiore. Uno studio effettuato su bovini (Lunstra, Coulter 1997) ha dimostrato che la concentrazione spermatica è peggiore per gradienti di temperatura scrotale minori, confermando quanto descritto in questo studio.

4.2 Conclusione

Lavori precedenti effettuati in vitro avevano dimostrato l'esistenza di una influenza diretta del GnRH sull'attività endocrina del testicolo di alpaca, considerandolo come uno dei principali fattori che modulano l'attività testicolare mediante fattori paracrini e/o autocrini. Lo studio effettuato ha dimostrato che anche in vivo esiste una risposta del testicolo di alpaca in seguito al test di stimolazione con GnRH. Nonostante la differenza nel tipo di risposta rispetto alla specie bovina, che allo stesso test risponde con un aumento e non con una diminuzione della temperatura scrotale, è stato possibile individuare dei pattern di variazione di questo parametro. Questo pattern ha rivelato una variabilità individuale, riscontrata ancor di più nello studio della flussimetria e nella misurazione della testosteronemia. Le correlazioni riscontrate tra questi parametri e la loro relazione con l'intensità ecografica testicolare, nonché la qualità seminale, ha dimostrato che esiste una corrispondenza tra questi criteri di valutazione e il tipo di risposta alla stimolazione con il GnRH. Questo conferma

il fatto di poter utilizzare le metodiche prese in considerazione nel presente protocollo per valutare la funzionalità testicolare di maschi riproduttori. Forse uno dei principali limiti di questo studio è stato il numero ridotto di esemplari valutati. Sarebbe in questo senso interessante effettuare altre indagini, su un maggior numero di soggetti, anche di altre specie animali, per poter affermare con più certezza i risultati ottenuti nel presente lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. Berry R.J., Kennedy A.D., Scott S.L., Kyle B.L., Schaefer A.L. Daily variation in the udder surface temperature of dairy cows measured by infrared thermography: potential for mastitis detection. *Canadian journal of Animal Science* 83:687-693;2003.
2. Bollwein Heinrich, Schulze Johann Joachim, Miyamoto Akio, Sieme Harald. Testicular blood flow and plasma concentrations of testosterone and total estrogen in the stallion after administration of human chorionic gonadotropin. *Journal of Reproduction and Development*, Vol. 54, n.5, 2008.
3. Bravo P.W., Flores D., Ordonez C., 1997 b. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of Reproduction*, vol. 57, pp. 520 - 524.
4. Bravo P.W., Flores U., Garnica J., Ordoñez C., 1997 a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, vol. 47, pp. 619 - 626.
5. Bravo P.W., Skidmore J.A., Zhao X.X., 2000. Reproductive aspects and storage of semen in Camelidae. *Animal Reproduction Science*, vol. 62, pp. 173 - 193
6. Cassini C., Pagnoni F., Tomasoni R. Analisi di insilati per foraggiamento mediante termografia. *L'informatore agrario* 15:67-73;1993.
7. Catone G., Parillo F., Vullo C., Castellucci B., Zerani M. GnRH in vitro effect and occurrence of GnRH receptor in the testis of alpaca. *Società Italiana di Riproduzione Animale (S.I.R.A.), VII Congresso Nazionale, Messina 2-3 luglio 2009.*
8. Cook R.B., Coulter G.H., Kastelic J.P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation, and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. *Theriogenology*, Volume 41, Issue 3, 2 February 1994, Pages 653-671.
9. Cunningham James G. Fisiologia della riproduzione nel maschio. In: *Manuale di fisiologia veterinaria 3ed.* 2006. Antonio Delfino Editore.

10. Dubinsky Theodore J., Chen Phebe, Maklad Nabil. Color-flow and power doppler imaging of the testis. *World journal of urology* (1998) 16: 35-40
11. Eddy A.L., van Hoogmoed L.M., Snejder J.R. Review: the role of thermography in the management of equine lameness. *Vet J.* 162:172-181;2001.
12. Flir Systems. Thermacam researcher user's manual. 2004
13. Flir Systems: <http://www.flirthermography.com/italy/cameras/camera/1020>
14. Foresta C., Selice R., Menegazzo M, Bottacin A., Garolla A., Plebani M., Ferlin A. Significato clinico del dosaggio dell'FSH in relazione ai parametri seminali. In: Significato laboratoristico e clinico dell'FSH; Carlo Foresta, Alberto Ferlin, Andrea Lenzi. CLEUP SC, 2007.
15. Gabor G., Sasser R.G., Kastelic J.P., Coulter G.H., Everson D.O., Falkav G., Mezes M., Bozo S., Cook R.B., Volgyi Csik J., Barany I., Szasz Jr. F. Endocrine and thermal responses to GnRH treatment and prediction of sperm output and viability in holstein-friesian breeding bulls. *Theriogenology* 50:177-183, 1998.
16. Garner D.L., Underwood H.B., Porter W.F. Use of modern infrared thermography for wildlife population surveys. *Environmental management* 19:233-238;1995.
17. Günzel-Apel A-R, Möhrke C., Nautrup C. Poulsen. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: Physiological and pathological findings. *Reproduction in domestic animals*, 2001, vol. 36, n°5, pp. 236-240 (19 ref.)
18. Gyorgy Gábor, John P. Kastelic, R. Byrne Cook, R. Garth Sasser, Leonardo F.C. Brito, József Völgyi Csik, Glenn H. Coulter, István Györkös. Effects of GnRH treatment on scrotal surface temperatures in bulls. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2001;65:60-63.
19. Hurnik J.F., Webster A.B., DeBoer S. An Investigation of Skin Temperature Differentials in Relation to Estrus in Dairy Cattle Using a Thermal Infrared Scanning Technique. *Journal of Animal Science* 61:1095-1102;1985.

20. Kastelic J.P., Coulter G.H., Cook R.B. Scrotal surface, subcutaneous, intratesticular, and intraepididymal temperatures in bulls. *Theriogenology*, Volume 44, Issue 1, July 1995, Pages 147-152.
21. Kastelic J.P., Cook R.B., Coulter G.H. Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Animal Reproduction Science* 45 (1997) 255-261.
22. LOGIQ P5/A5 Advanced reference manual. Direction 5150817-100 Rev. 1, Technical Publications. GE Medical Systems
23. Loughmiller J.A., Spire M.F., Dritz S.S., Fenwick B.W., Hosni M.H., Hogge S.B. Relationship between mean body surface temperature measured by use of infrared thermography and ambient temperature in clinically normal pigs and pigs inoculated with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *American Journal of Veterinary Research*. 62(5): 676:681;2001.
24. Lunstra, D.D., Coulter, G.H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural mating fertility in beef bulls. *J. Anim. Sci.* 75, 767-774, 1997.
25. McDonald L.E., Pineda M.H. Male Reproduction. In: *Veterinary Endocrinology and Reproduction*, 4th edition, 1989, Lea and Febiger, Philadelphia, London.
26. Morgante M, Stelletta C, Giancesella M, Zanolla M. Tesi di laurea: "Uso della termografia ad infrarossi in campo veterinario: esperienze preliminari su alcune applicazioni pratiche". Anno accademico 2005-2006.
27. Navarotto P, Guarino M, Vincenti M, Garavaglia V. La termografia per verificare la qualità costruttiva delle stalle. *L'informatore agrario* 2: 57-60;2003.
28. Nickel R., Schummer A., Seiferle E. Organi genitali maschili dei Ruminanti. In: *Trattato di Anatomia degli Animali Domestici*, volume II. Prima edizione italiana 1979 (ristampa 2004). Casa Editrice Ambrosiana Milano.

29. Nikkhah A, Plaizier J.C., Einarson M.S., Berry R.J., Scott S.L., Kennedy A.D. Short communication: Infrared thermography and visual examination of hooves of dairy cows in two stages of lactation. *Journal of dairy science* 88:2749-2753;2005.
30. Nyland Thomas G., Mattoon John S. Physical principles, instrumentation and safety of diagnostic ultrasound. Echocardiography. In: *Small animal diagnostic ultrasound 2nd edition*, 2002, Saunders.
31. Post T.B., Christensen H.R., Seifert G.W. Reproductive performance and productive traits of beef bulls selected for different levels of testosterone response to GnRH. *Theriogenology* 1987;27:317-328.
32. Radicioni A.F. Metodiche per il dosaggio dell'FSH. In: *Significato laboratoristico e clinico dell'FSH*; Carlo Foresta, Alberto Ferlin, Andrea Lenzi. CLEUP SC, 2007.
33. Schaefer A.L., Jones S.D.M., Tong A.K.M., Vincent B.C. The effect of fasting and transportation in beef cattle. Acid- base electrolyte balance and infrared heat loss of beef cattle. *Livestock Production Science* 69:491-495; 1988.
34. Scott S.L., Schaefer A.L. Tong A.K.W., Lacasse P. Use of infrared thermography for early detection of mastitis in dairy cows. *Canadian journal of Animal Science* 80:764-765;2000.
35. Sharpe Richard M. Intratesticular Factors Controlling Testicular Function. *Biology of Reproduction* 30, 29-49 (1984).
36. Shurich Matthias, Aigner Friederich, Frauscher Ferdinand, Pallwein Leo. The role of ultrasound in assesment of male fertility. *European journal of obstetrics and ginecology and reproductive biology* 144S (2009) S192-S198.
37. Stelletta C., D'Alterio G., Stefani A., Moro L., Bevilacqua F., Romagnoli S. Determinazione con metodo in chemiluminescenza dei livelli ematici di progesterone e testosterone in alpaca allevati in Italia. *Società Italiana di Riproduzione Animale (S.I.R.A.), VI Congresso Nazionale, Lodi 12-14 giugno 2008.*

38. Tessier M, Du Tremblay D, Klopfenstain C, Beauchamp G, Baulianne M. Abdominal skin temperature variation in broiler chickens as determined by thermography. *Poultry Science* 82:846-9;2003
39. Tibary A., Vaughan J. Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: a review and clinical observations. *Small Ruminant Research* 61 (2006) 283-298.
40. Tivey D, Benhazi T. The potential to assess environmental conditions within pig production system. 2002.
41. Turchi P. Correlazione tra FSH plasmatici, parametri seminali e funzionalità tubulare. In: *Significato laboratoristico e clinico dell'FSH*; Carlo Foresta, Alberto Ferlin, Andrea Lenzi. CLEUP SC, 2007.
42. Turner T.A. Thermography as an aid to the clinical lameness evaluation. *Vet Clin North America Equine Practice*. 7(2):311-38;1991.
43. Vaughan Jane, Galloway David, Hopkins David. Artificial Insemination in alpacas. A report for the rural Industries Research and Development Corporation, Australian Government (2003). RIRDC publication N 03/104.
44. Wekerle L. The GnRH test in bulls. *Magyar Alltorvosok Lapja* 1989; 44:19-22.
45. Zelli R. Studio della vascolarizzazione testicolare dello stallone mediante eco color doppler: risultati preliminari. Società Italiana di Riproduzione Animale (S.I.R.A.), V Congresso Nazionale, Alghero 17-19 maggio 2007.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio tutti coloro che hanno contribuito alla realizzazione di questo lavoro, primo fra tutti il Dott. Calogero Stelletta.