



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**  
**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

---

DOTTORATO DI RICERCA IN  
“Scienze Veterinarie”  
Coordinatore: Prof.ssa Adriana Ferlazzo  
S.S.D.: VET/10

---

**IMPIEGO DELL'ECOGRAFIA DOPPLER NELLA  
VALUTAZIONE DEL CORPO LUTEO AI FINI DELLA  
VALUTAZIONE DELLA BOVINA RICEVENTE E  
DONATRICE IN PROGRAMMI DI EMBRYO TRANSFER**

Dottorando:

Dott.<sup>ssa</sup> Flavia Pruiti Ciarello

Tutor:

Chiar.<sup>mo</sup> Prof. Gabriele Marino

---

XXXI CICLO: 2015-2018

## SOMMARIO

<u>ABSTRACT.....</u>	<u>3</u>
<u>INTRODUZIONE.....</u>	<u>6</u>
<u>VARIAZIONI EMODINAMICHE DEL CORPO LUTEO .....</u>	<u>14</u>
<u>VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' LUTEALE:</u> <u>METODI CLASSICI .....</u>	<u>17</u>
<u>VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' LUTEALE:</u> <u>ECOGRAFIA DOPPLER.....</u>	<u>20</u>
<u>PRINCIPI DI BASE DELLA TECNOLOGIA DOPPLER:</u> <u>COLOR FLOW MODE E POWER MODE.....</u>	<u>22</u>
<u>ARTEFATTI.....</u>	<u>29</u>
<u>INTERPRETAZIONE DELLE IMMAGINI DOPPLER NELLO STUDIO</u> <u>DELLA PERFUSIONE LUTEALE .....</u>	<u>31</u>
<u>SCOPO DEL LAVORO .....</u>	<u>33</u>
<u>MATERIALI E METODI.....</u>	<u>34</u>
<u>STATISTICA.....</u>	<u>40</u>
<u>RISULTATI.....</u>	<u>41</u>
<u>DISCUSSIONE .....</u>	<u>49</u>
<u>BIBLIOGRAFIA .....</u>	<u>62</u>
<u>APPENDICE I: ARTEFATTI .....</u>	<u>76</u>
<u>APPENDICE II: MATERIALI E METODI.....</u>	<u>78</u>
<u>APPENDICE III : RISULTATI.....</u>	<u>81</u>
<u>APPENDICE IV: DISCUSSIONE .....</u>	<u>88</u>

---

## ABSTRACT

---

La selezione delle bovine donatrici e riceventi in programmi di *embryo transfer* rappresenta un limite all'applicazione di tale tecnica. L'ecografia doppler, negli ultimi anni, si è configurata come una delle principali innovazioni in buiatria e ha trovato principalmente applicazione nello studio della funzionalità luteale. L'obiettivo del lavoro è stato di valutare le variazioni delle dimensioni del corpo luteo (CL) e della sua perfusione (LBF), mediante due modalità doppler, *color mode* (CFM) e *power mode* (PFM) nel corso di un ciclo estrale a due ondate follicolari, in bovine ritenute idonee per programmi di *embryo transfer*. Lo scopo ultimo è stato di estrapolare valori predittivi per la selezione di riceventi e donatrici. Sono state selezionate e sincronizzate n°10 bovine da latte, di razza Frisona. A partire dal 3°- 4° giorno post-estro (PE), la valutazione dell'LBF è stata effettuata in CFM e PFM, ad intervalli di 4 giorni fino alla comparsa dell'estro successivo. L'LBF è stato quantificato *off-line*, mediante stima visiva e oggettiva a mezzo di un sistema di analisi d'immagine. I test di Student e ANOVA sono stati

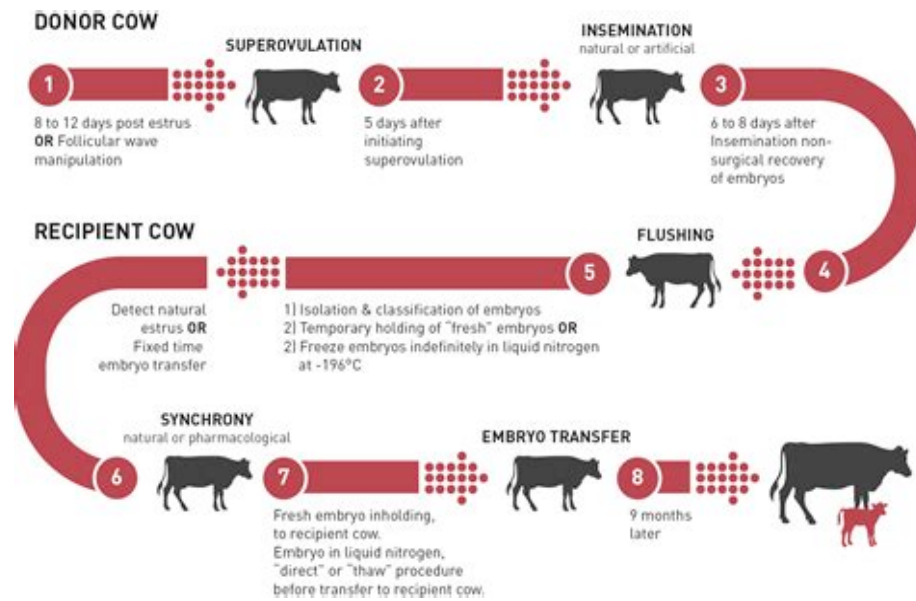
utilizzati per l'analisi statistica. I risultati hanno indicato che il rilievo dell'LBF e dell'area luteale al netto della cavità (RACL) è ripetibile e che esistono variazioni individuali sia per la RACL che per l'LBF calcolati in CFM, nelle fasi di crescita e di regressione luteale. L'impiego del *visual score* consente solo la distinzione di un CL funzionale da uno non funzionale (assenza di flusso) e non è indicato per le valutazioni più sensibili in quanto sovrastima il flusso. Il PFM sembra essere la metodica più accurata per la valutazione dell'LBF, sebbene a 15-16 gg PE è anch'essa viziata da fattori individuali ( $p < 0,01$ ). Lo studio della RACL e dell'LBF durante un ciclo estrale a due ondate potrebbe consentire di distinguere 3 fasi: una fase di formazione del CL (3-4 gg PE) con LBF di  $0,3 \pm 0,3 \text{ cm}^2$  su una RACL di  $3,1 \pm 0,9 \text{ cm}^2$ , una fase funzionale del CL (7-16 gg PE) con LBF di  $0,7 \pm 0,4 \text{ cm}^2$  su una RACL di  $4,8 \pm 0,8 \text{ cm}^2$  e una fase di regressione (19-20 gg PE) con livelli minimi di perfusione luteale  $0,1 \pm 0,1 \text{ cm}^2$  in un CL di  $3,3 \pm 0,6 \text{ cm}^2$ . Secondo questo studio, il CL tra 7 e 16 gg non presenta variazioni significative dell'area perfusa e le variazioni dimensionali sono troppo sottili per essere apprezzate clinicamente. Dall'analisi è possibile

estrapolare che una buona ricevente a 7-8 gg PE, dovrebbe avere un CL con diametro superiore a 2 cm con un flusso calcolato in PFM di  $0,8 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ . Una buona donatrice prima del protocollo di superovulazione (11-12 gg PE) dovrebbe avere un diametro del CL di circa 2,5 cm, con un flusso calcolato in PFM di  $0,7 \pm 0,4 \text{ cm}^2$ .

## INTRODUZIONE

---

La *Multiple Ovulation Embryo Transfer* (MOET) o *l'Embryo Transfer* (ET) è una tecnica riproduttiva ampiamente diffusa nella specie bovina, praticata nelle aziende zootecniche da più di un quarantennio con lo scopo di ottenere un rapido miglioramento genetico ed un incremento della produttività sia delle bovine da latte che da carne. Tale tecnica comporta un incremento considerevole del numero dei discendenti di bovine di un certo valore genetico e commerciale. Una bovina generalmente genera 1 vitello l'anno e 4-5 in tutta la sua vita; con la MOET è potenzialmente in grado di generare 6-8 embrioni ogni 2 mesi. Nella specie bovina, questa tecnica riproduttiva ormai abbastanza diffusa permette di prelevare uno o più embrioni da un soggetto definito "donatrice" e trasferirli ad altri soggetti "riceventi". Tutte le operazioni possono essere effettuate direttamente in allevamento e il trasferimento degli embrioni nella ricevente può anche effettuarsi altrove, vista la possibilità di congelare gli embrioni prelevati.



La prima prova coronata da successo che ha portato alla nascita di un vitello da una procedura di ET ha avuto luogo nel 1951 (Willet et al 1951) e nel 1973 è nato il primo vitello in seguito al trasferimento di un embrione congelato (Wilmut e Rowson 1973). Nel 1976, con l'applicazione di tecniche non chirurgiche per il prelievo degli embrioni, l'ET cominciò ad essere diffuso nelle razze da latte. Negli anni 90 la tecnica è stata affinata con il sessaggio embrionale e con lo *splitting*. Oggi le nuove frontiere sono l'utilizzo del seme sessato, la biopsia embrionale per la genomica, l'*embryo therapy*. Si calcola che ogni anno si effettuano nel mondo 100000 *flushing*, la metà circa solo in Nord America, maggiormente diffusa nelle razze da latte (57%) che da

carne (43%), per un totale di circa 700000 embrioni. In Europa, Olanda e Francia effettuano circa 6000 *flushing*, l'anno, l'Italia 2000 (Dati IETS).

La MOET si esplica attraverso diverse fasi:

- Selezione delle bovine donatrici e delle riceventi
- Sincronizzazione dei cicli delle donatrici e delle riceventi
- Superovulazione delle donatrici
- Fecondazione
- *Flushing* o recupero degli embrioni
- Valutazione degli embrioni e stoccaggio a breve o lungo termine
- Trapianto embrionale nelle riceventi

Il vero fattore limitante della MOET rimane la selezione della bovina donatrice, poiché il 70% degli embrioni raccolti deriva dal 30% delle donatrici superovulate (Guarneri et al 2013); da ciò si evince che poche sono le “ottime” donatrici e l'importanza di una selezione oculata che risponda a precisi criteri.

Indipendentemente dall'impiego dei criteri di selezione della donatrice (anamnesi riproduttiva, età e stato nutrizionale), una bovina è classificata come buona o cattiva donatrice solo quando



verrà sottoposta a un trattamento di superovulazione. Mancano cioè ad oggi criteri predittivi affidabili.

La bovina che sarà sottoposta a un trattamento di superovulazione dovrà possedere dei requisiti minimi. Il primo criterio da considerare è la reale superiorità genetica del soggetto. La bovina deve essere iscritta agli albi genealogici e gli embrioni ottenuti devono essere parimenti di alta qualità genetica ed avere mercato. Uno dei principali fattori che influenza negativamente i risultati è la gestione non ottimale della donatrice per esigenze aziendali. Ad esempio si ricorre a trattamenti superovulatori troppo precoci nel post-partum; infatti situazioni metaboliche particolari che si sono verificate anche 2 mesi prima del trattamento superovulatorio possono interferire con la risposta superovulatoria. Importante altresì il periodo di transizione che per le donatrici deve essere gestito con molta attenzione evitando gli stress di qualsiasi natura (Guarneri et al. 2013).

Prima di iniziare un protocollo di superovulazione è opportuno analizzare le *performance* di fertilità e di fecondità della bovina donatrice, mediante indagine clinico-anamnestica e poi mediante l'impiego di indagini collaterali strumentali. Una bovina

cl clinicamente sana e fertile con ciclo regolare è da preferire rispetto alle bovine “problema”. Da un’accurata anamnesi dovrà emergere che la bovina donatrice non abbia presentato condizioni patologiche quali complicazioni puerperali, ritenzioni placentari e infezioni uterine e che si trovi in uno stato di bilancio energetico positivo. Dovrà inoltre aver manifestato almeno 2-3 calori con intervalli regolari. Inoltre i trattamenti antiparassitari e le vaccinazioni dovranno essere effettuate almeno 30 giorni prima del trattamento di superovulazione (Guarneri et al. 2013).

Una visita ginecologica completa consentirà di escludere eventuali lesioni del tratto genitale; l’esplorazione rettale consentirà di valutare la dimensione della cervice e delle corna uterine. Un esame ecografico è importante non solo al fine di escludere eventuali patologie a carico delle ovaie e dell’utero, ma anche al fine di valutare il *pool* follicolare mediante conta dei follicoli superiori a 2-3 mm di diametro e fare una previsione della superovulazione. Infatti, il controllo dell’ondata follicolare e la valutazione del numero di follicoli presenti al momento della superovulazione può migliorare la quota di embrioni trasferibili (Singh et al. 2004). Con lo stesso scopo è stato proposto il

dosaggio dell'ormone antimulleriano (AMH), prodotto in maniera proporzionale da tutti i follicoli antrali presenti nell'ovaio (Hirayama et al. 2017), ma ad oggi la tecnica non è totalmente standardizzata.

Al fine di controllare l'ondata follicolare, si ritiene utile annullare l'effetto del follicolo dominante con metodi meccanici (aspirazione) (Baracaldo et al. 2000) o farmacologici basati sull'uso dell'estradiolo (vietato in Europa) e sostituiti non adeguatamente dal GnRH o dall'HCG (Bò et al. 2008).

Risulta essere di fondamentale importanza che, al momento della superovulazione la bovina donatrice abbia un corpo luteo funzionale, in quanto il progesterone prodotto sincronizza l'ondata follicolare. Secondo alcuni Autori, essendo la dimensione del corpo luteo correlata alla concentrazione di progesterone, le bovine con CL grandi e livelli di progesterone elevati potrebbero rispondere meglio alla superovulazione (Kudlač et al. 1991; Kayacik et al. 2005).

Secondo altri Autori, valori elevati di progesterone disturberebbero l'ondata follicolare inibendo lo sviluppo dei follicoli che non raggiungerebbero un diametro idoneo

all'ovulazione (Tamboora et al 1985).

Nella pratica, si accerta che la donatrice abbia un corpo luteo funzionale mediante metodi classici (palpazione ed ecografia B-mode). Non ci sono dati "ad oggi" sulle caratteristiche del flusso di questo corpo luteo.

Il trasferimento di embrioni viene effettuato su vacche o su manze, preventivamente selezionate sulla base dell'età, delle caratteristiche morfologiche (BCS) e di quelle relative alle manifestazioni del ciclo estrale.

E' infatti fondamentale che la ricevente possieda il giorno del trapianto un corpo luteo di 7 giorni circa, con ottime caratteristiche morfologiche. Ciò si ottiene attraverso protocolli di sincronizzazione o sfruttando i calori naturali, mentre la qualità del corpo luteo è invece classicamente valutata attraverso uno specifico esame clinico dell'apparato genitale prima di procedere al trapianto. Recentemente è stato studiato l'impiego dell'ecografia Doppler per la selezione delle riceventi migliori (Kanazawa et al. 2016; 2017).

E' inoltre essenziale che la ricevente abbia una conformazione tale da garantire la nascita di vitelli di grandi dimensioni. In

genere si selezionano manze cicliche, di 14–15 mesi di età che abbiano raggiunto un peso di almeno 350 kg al momento del trasferimento.

# **VARIAZIONI EMODINAMICHE**

## **DEL CORPO LUTEO**

---

Il corpo luteo (CL) è un organo ghiandolare temporaneo che si sviluppa a partire da un follicolo dopo avvenuta ovulazione. Le fasi di crescita, formazione e regressione sono caratterizzate e da un'intensa attività di angiogenesi e di rimodellamento vascolare (Niswendel et al. 2000; Reynolds et al. 2000; Acosta et al. 2003).

Il CL maturo è stato definito come l'organo più vascolarizzato dell'organismo per unità di tessuto (Wiltbank et al. 1988). Dal punto di vista anatomico presenta una struttura vascolare definita; infatti si distinguono tre differenti categorie di arterie: capsulari, settali e parenchimatose. Le prime originano da una singola arteria spirale localizzata alla base del CL (Koenig e Amselgruber 1986; Yamada et al. 1995); dalle seconde originano le arteriole settali che ne definiscono la struttura lobulare e da quest'ultime originano le arteriole parenchimatose che danno vita a una fitta rete di capillari fenestrati (Findlay 1986). Nel corso di un ciclo estrale il CL e la sua vascolarizzazione si sviluppano e regrediscono in una breve finestra temporale e per certi versi il

tasso di crescita e di angiogenesi è equiparabile a quello di una neoformazione tumorale (Reynold et al. 2000). Dopo l'ovulazione si verifica un'intensa attività angiogenetica che accompagna il CL nella fase di crescita e formazione. Gli aspetti fisiologici delle variazioni emodinamiche del CL, sono stati chiariti nell'ultimo decennio, grazie allo studio della perfusione luteale mediante l'impiego dell'ecografia Doppler (Acosta et al. 2003; Acosta e Myamoto 2004; Myamoto et al. 2005; Ghinter 2007; Herzog et al. 2010). Il flusso ematico luteale (LBF) aumenta gradualmente già a partire dal 2° giorno postovulazione; durante la fase iniziale di crescita (4-7 gg) l' LBF aumenta rapidamente (Acosta et al. 2003) fino a raddoppiare nella fase di crescita statica (8-16 gg) (Herzog et al 2010). In questa fase il CL ormai strutturalmente maturo, arresta la sua crescita dal punto di vista dimensionale ma l' LBF continua ad aumentare raggiungendo il picco al 14° e 16° giorno (Herzorg et al. 2010). Durante la fase di regressione luteale (17-21 gg), l'involuzione funzionale precede quella strutturale (Niswendel et al. 2000; Myamoto et al. 2005) e il rilascio pulsatile di  $PGF2\alpha$  induce una rapida riduzione dell'LBF di circa il 50% (Acosta et al. 2002;

Acosta e Miyamoto 2004; Utt et al. 2009; Herzog et al. 2010),  
invece la regressione strutturale del CL avviene più lentamente se  
confrontata all'LBF e alle concentrazioni sieriche di P4 (Herzog  
et al. 2010; Luttgenau et al. 2014).



## VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA'

### LUTEALE: METODI CLASSICI

---

In ginecologia bovina, la capacità di riconoscere un CL funzionale è un prerequisito indispensabile per una buona gestione riproduttiva della mandria. Il *gold standard* della funzionalità luteale è rappresentato dalle concentrazioni sieriche di P4  $\geq 1,0$  ng/ml. La palpazione trans-rettale e/o l'ultrasonografia (US) rappresentano le tecniche più comuni (Mc Dougall e Rhodes 1999; Bicalho et al. 2008). La prima tecnica valuta lo stato funzionale del CL in base alla consistenza e alla dimensione percepita alla palpazione; durante la fase iniziale di crescita luteale (1-5 gg) si percepisce come una struttura a superficie liscia e depressibile che può essere confusa con una struttura follicolare (Hanzen et al. 2000); durante la fase di crescita intermedia (6-18 gg) si apprezza come una struttura rotondeggiante a superficie liscia, ben distinguibile dalle altre strutture ovariche e con una consistenza simile a quella di un organo parenchimoso (*liver-like*); in fase di regressione (dal

18° g) assume una consistenza dura e può essere palpato fino a 1-3 giorni prima dell'ovulazione successiva; Mediante US, il CL è valutato in base ai parametri, ecogenicità e dimensione; in condizioni di campo con macchine ultrasonografiche portatili e con sonda lineare per uso endocavitario (5-7,5 MHz) il CL può essere visualizzato solo a partire dal 3°-4° g poiché presenta margini irregolari ed è ecogeno con lo stroma ovarico; invece il CL maturo presenta contorni netti e ben definiti e ha l'apparenza di una struttura finemente granulare ipoecoica rispetto allo stroma ovarico (Des Coteaux et al. 2010). In tarda fase di regressione luteale, si presenta con contorni irregolari ed è più ecogeno rispetto allo stroma ovarico che lo circonda. La palpazione transrettale ha un valore limitato e se paragonata all'impiego dell'US, il valore predittivo positivo e negativo, è migliore per quest'ultima ed entrambe le tecniche sono poco sensibili e poco specifiche nella fase iniziale di crescita e regressione luteale (Pieterse et al. 1990; Hanzen et al. 2000; Bicalho et al. 2008). Sebbene l'avvento dell'US B-Mode nel 1980 ha rivoluzionato l'approccio clinico alla riproduzione bovina essa è limitata solo a una valutazione morfologica

(Matsui e Myamoto 2009; Bollwein et al. 2016). Un aspetto emergente della diagnostica per immagini, è rappresentato dall'impiego dell'ecografia che sfrutta la tecnologia Doppler, che grazie alla possibilità di valutare il LBF aggiunge al B-Mode, non solo informazioni riguardo l'anatomia ma anche riguardo lo stato funzionale e sarà discussa dettagliatamente nei capitoli che seguono.

# **VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA'**

## **LUTEALE: ECOGRAFIA DOPPLER**

---

La funzionalità del CL dipende dal grado di perfusione del tessuto ghiandolare luteale in quanto espressione indiretta della capacità di produrre P4 (Miyamoto et al. 2006). Diversi studi in precedenza hanno già dimostrato una correlazione positiva tra LBF e concentrazioni sieriche di P4 nella bovina (Herzog et al. 2010; Battocchio et al. 2012; Bollwein et al. 2013; Kaya et al. 2016). L'assenza di segnale doppler, in un CL di dimensione e morfologia normale, è la diretta espressione di una scarsa perfusione e quindi indice di non funzionalità. Lo studio della morfologia del CL (dimensione, ecogenicità) mediante US B-Mode è un indice meno sensibile rispetto la valutazione della perfusione luteale (Miyamoto et al. 2005; Herzog et al. 2010). L'applicazione della tecnologia doppler in ginecologia bovina ha trovato impiego principalmente nella valutazione della perfusione luteale, per la diagnosi precoce di non gestazione, già a partire dal 21° giorno post fecondazione artificiale (Miyamoto et al. 2009; Utt et al. 2009; Siqueira et al. 2013) e infine per la

selezione delle bovine riceventi nei programmi di ET al 7°-8° PO (Pinaffi et al. 2015; Kanazawa et al. 2016). Inoltre, la valutazione delle variazioni emodinamiche dell'LBF, ha permesso una migliore comprensione del ciclo estrale della bovina (Bollwein et al. 2013; Matsui e Miyamoto 2009).

## **PRINCIPI DI BASE DELLA TECNOLOGIA**

### **DOPPLER :COLOR E POWER FLOW MODE**

---

Nel 1841, per la prima volta è stato descritto l'effetto *doppler*, si tratta di un fenomeno fisico caratterizzato da un cambiamento della frequenza degli ultrasuoni che ha luogo quando la sorgente delle onde sonore si avvicina o si allontana dal trasduttore. In US Doppler, la sorgente degli ultrasuoni è rappresentata dai globuli rossi in movimento e il recettore è rappresentato dal trasduttore. La differenza delle frequenze emesse e di quelle ricevute determina un *doppler shift*. In diagnostica per immagini viene sfruttato in due modalità: doppler continuo (CW) e doppler pulsato (PW); e può essere tradotto in un'immagine a colori (*Color Flow Mode* e *Power Flow Mode*) o in un grafico (*Spectral Mode*); nel primo caso se è positivo, è codificato in rosso, se è negativo in blu; nel secondo caso si tramuta in un grafico in cui le ordinate rappresentano la velocità e le ascisse il tempo (Myron et al. 2014; Bollwein et al. 2016). La differenza tra le due modalità (CW e PW) risiede nella tecnologia dell'emissione degli ultrasuoni. In CW, i cristalli piezoelettrici sono attivati in

modo continuo con il vantaggio di essere più sensibile per il rilievo di flussi ad alta velocità (Herzorg e Bollwein 2007). In PW, i cristalli piezoelettrici sono attivati ad intermittenza dai *pulse* elettrici e gli echi di ritorno sono ricevuti da un unico elemento (Ginther e Utt 2004; Myron et. al 2014). Il *Color Flow Mode* (CFM) e il *Power Flow Mode* (PFM) rappresentano invece, un'evoluzione del PW in cui il flusso ematico è rappresentato da una mappa di colori che si sovrappone all'immagine B-Mode; il primo dipende dalla velocità e dalla direzione del flusso mentre il secondo dipende solo dall'intensità degli echi di ritorno. Il CFM rappresenta un'evoluzione del doppler pulsato, ma a differenza di questo consente di selezionare una finestra di studio più ampia e non di un singolo volume campione e l'immagine ottenuta è il risultato dell'analisi simultanea dei *doppler shift* di ciascun volume campione; il codice colore che ne deriva indica la direzione del flusso in relazione alla posizione del trasduttore (Ginter 2007; Ferreira et al. 2011). Il CFM ha il vantaggio di fornire in *real-time*, informazioni immediate relative all'estensione della vascolarizzazione e della direzione del flusso. Invece la velocità

è codificata dalla saturazione del colore rappresentato dalle diverse gradazioni di rosso e blu e convenzionalmente la saturazione è inversamente proporzionale alle velocità del flusso. I parametri velocità/colore sono riportati su una scala e le gradazioni del blu si riferiscono al flusso in allontanamento in relazione al trasduttore, le gradazioni del rosso invece indicano un flusso in avvicinamento. Il CFM è stato impiegato per lo studio della perfusione luteale nella bovina per la valutazione semiquantitativa del flusso mediante il calcolo di indici indiretti (Acosta et al. 2002; 2003; Kanazawa et al. 2016; 2017). Dall'analisi bibliografica degli studi condotti sulla perfusione luteale mediante l'impiego della modalità CFM emerge che la metodica di scansione è operatore dipendente; vi è inoltre una grande variabilità di settaggi e di macchine ultrasonografiche impiegate. I parametri che presentano maggiore variabilità sono rappresentati dal *pulse repetition frequency* (PRF) e dal guadagno totale (GT). Il PRF rappresenta la frequenza di trasmissione delle onde ultrasonore e nella maggior parte delle macchine ecografiche è correlato ad una scala in cui viene settato il limite massimo di velocità di flusso rilevabile. La scelta di



quest'ultimo parametro è di fondamentale importanza per il rilievo dei flussi a bassa velocità e dovrebbe non essere inferiore a 6 cm/s (Herzog et al. 2011; Guimaraes et al 2015; Kanazawa et al. 2016; 2017). Il PRF è direttamente proporzionale alla velocità del flusso, pertanto, se lo scopo è quello di studiare la perfusione di un distretto capillare, vanno impiegati bassi valori di PRF, tuttavia valori al di sotto di 1 KHz aumentano il rischio della comparsa di artefatti come l'*aliasing* soprattutto se vi sia interferenza con flussi più veloci (Guimaraes et al. 2015). Se invece, i valori di PRF sono alti, i flussi più lenti non verranno rilevati. Tuttavia nella maggior parte degli studi in cui lo scopo era quello di stimare in modo diretto la perfusione luteale, il settaggio della macchina prevedeva l'impiego di PRF bassi con un range che andava da un minimo di 0,6 KHz (Guimaraes et al. 2015) a un massimo di 1 KHz (Siquiera et al. 2013). Il controllo del GT nel settaggio della macchina ecografica può essere paragonato alla regolazione del volume audio in uno stereo ed ha la stessa funzione in B-Mode. Un guadagno troppo elevato rischia di dare origine a una over-saturazione e comparsa di *blooming artifact*, viceversa un guadagno troppo basso determina

una perdita di segnale colore. I valori di guadagno impiegati negli studi della perfusione luteale sono anch'essi variabili con una media del 58% (Guimaraes et al. 2015). Il settaggio ottimale di questi due parametri risulta essere determinante per l'ottenimento di immagini di buona qualità, che possano essere interpretabili e che abbiano una buona risoluzione in assenza di artefatti (Guimaraes et al. 2015).

Il PFM, definito anche come *Energy-Mode*, è una più recente evoluzione del CFM e si configura come una tecnica più sensibile rispetto al CFM (Ginther 2007; Bollwein et al. 2013; Luttgenau e Bollwein 2014), poiché risulta essere indipendente dall'angolo di insonizzazione, dalla velocità e dalla direzione del flusso. Inoltre non è influenzato dall'*aliasing* e dal *blooming* (discussi in seguito), poiché il parametro velocità è escluso nella trasduzione del segnale. Per queste caratteristiche è stata impiegata come tecnica di elezione per lo studio della perfusione luteale (Herzog et al. 2010; Brozos 2012; Bollwein et al. 2013; Scully et al. 2015; Trevisol et al. 2015; Kaya et al. 2017; Kalley et al. 2017). A differenza delle altre tecniche, il codice colore che deriva è la diretta espressione non della velocità o della direzione

del flusso ma della quantità intesa come intensità di flusso (numero di globuli rossi che attraversano un vaso per unità di tempo) nel distretto oggetto di studio (Ginther 2007). Analogamente al CFM, il codice colore si sovrappone alla modalità B-Mode e consente un'analisi diretta e immediata dell'LBF. Se il PFM è comparato con altre tecniche, per lo studio di distretti a bassa velocità di flusso o in cui non si conosce né la direzione dei vasi né la velocità del flusso nei plessi capillari, questa si configura come la tecnica a oggi più sensibile per lo studio della perfusione luteale o follicolare (Utt et al. 2009, Bollwein et al. 2016). Riassumendo, se si tiene conto dell'anatomia vascolare del CL, caratterizzata dal percorso tortuoso dei vasi, di cui non si conosce né la direzione e né la velocità del flusso, la modalità CFM è meno idonea per lo studio di questi distretti (Ferriera et al. 2011; Viana et al. 2013), sebbene l'impiego di fattori di correzione e il calcolo di indici indiretti ne abbiano comunque consentito l'uso (Acosta et al. 2003-2004; Russo et al. 2010; Guimaraes et al. 2015; Kanazawa et al. 2016-2017). Il PFM essendo indipendente dai parametri velocità e direzione, si configura come la tecnica più appropriata

(Ginther 2007; Bollwein et al. 2013; Luttgenau et al 2014) e più frequentemente utilizzata (Herzog et al. 2010; Brozos et al. 2012; Scully et al. 2015; Kalley et al. 2017; Kaya et al 2017). Da quanto detto sopra, segue che la scelta della modalità da impiegare dipende non solo dal tipo di risposta che si vuole ottenere ma soprattutto dall'anatomia e dall'emodinamica del distretto da indagare.

## ARTEFATTI

---

Nell'US Doppler gli artefatti di più comune riscontro sono rappresentati da *aliasing*, *blooming* e *flash artifacts* (artefatti da movimento). L'*aliasing* si palesa solo con l'impiego della tecnologia CFM, tipico del doppler pulsato ed è il risultato della distorsione del segnale doppler per le alte velocità di flusso. Nella codifica del segnale si ha essenzialmente un'alterazione della mappa colore in quanto descrive un flusso che va nella direzione opposta a quella reale. Si verifica quando l'impostazione della gamma di velocità è bassa o quando il PRF è basso (Fig. 1). La correzione si ottiene aumentando l'intervallo di velocità e il PRF (Fig.2). Il *blooming* si verifica quando la regolazione del GT è alta e i segnali di colore si estendono oltre il lume vascolare. La modalità PFM è meno soggetta al *blooming* rispetto al CFM convenzionale mentre invece non è soggetta ad *aliasing* in quanto indipendente dalla velocità. L'artefatto di movimento (Fig.3) è determinato dalle interferenze causate dal movimento dell'animale, dalla peristalsi intestinale, dal movimento del trasduttore e infine dalle interferenze elettriche e

può essere ridotto con una buona contenzione dell'animale. A differenza del CFM, il PFM è maggiormente soggetto a *flash artifact* se vengono impiegati valori di guadagno troppo alti (Ghinter 2007; Myron e Allan 2014).

# **INTERPRETAZIONE**

## **DELLE IMMAGINI DOPPLER**

### **NELLO STUDIO DELLA PERFUSIONE LUTEALE**

---

La stima della valutazione della perfusione luteale può essere sia di tipo oggettivo che soggettivo. Nel primo caso, è possibile fare un'analisi semiquantitativa del flusso mediante l'impiego di software dedicati: Imaje J® (Kanazawa et al.2016; Kanazawa et al. 2017 ); Pixel flux® (Herzog et al. 2010; Scully et al. 2015); Adobe Photo shop® (Acosta et al. 2003) e il valore ottenuto è espresso come unità di pixels di colore, come area espressa in cm<sup>2</sup> di tessuto perfuso o in valore percentuale; o mediante il calcolo di indici indiretti (Acosta et al. 2003; Herzog et al. 2010; Russo et al. 2010, Brozos et al. 2012; Scully et al. 2015; Kanazawa et al. 2016; Kanazawa et al.2017; Kelley et al. 2017).

La valutazione soggettiva della perfusione del CL, si basa sull'impiego di *visual score* (ad es. valore da 1 a 4) e l'operatore stabilisce un punteggio di vascolarizzazione sulla base di criteri predefiniti (Ginther 2007). L'impiego del *visual score* è stato fatto nel follicolo preovulatorio nell'uomo (Bhal et al. 1999) e

nelle cavalle (Gastal et al. 2006) e nel corpo luteo e delle bovine (Siqueira et al. 2013; Pugliesi et al. 2014; Treviso et al. 2015; Kelley et al. 2017). Il sistema di punteggio è soggettivo in quanto viene usato il giudizio dell'ecografista. Tuttavia, la conversione dei dati soggettivi nei dati oggettivi è sempre possibile a fini di ricerca. Il metodo visivo di stima del grado di perfusione è una tecnica rapida ed efficace, specialmente se usata per scopi clinici e in condizioni di campo (Ginther 2007). Studi precedenti, tuttavia, hanno riportato una correlazione positiva tra metodi di valutazione soggettiva e oggettiva del flusso sanguigno, sia per i follicoli che per il CL in una singola valutazione ( Ghetti et al. 2012; Siqueira et al. 2013).



## SCOPO DEL LAVORO

---

L'obiettivo del lavoro è stato di studiare, mediante l'applicazione dell'ecografia doppler le variazioni della perfusione luteale nelle differenti fasi del ciclo estrale nella bovina da latte. Lo studio è stato orientato a comprendere l'evoluzione del CL, in termini di dimensioni e perfusione durante un ciclo estrale normale di bovine da latte precedentemente ritenute idonee a programmi di *embryo transfer*, con l'obiettivo ultimo di estrapolare dei valori predittivi per la selezione delle migliori riceventi e donatrici.

## MATERIALI E METODI

---

La sperimentazione ha ottenuto parere positivo da parte del Comitato Etico del Dipartimento di Scienze Veterinarie con codice 010/2016. Lo studio comprendeva una fase pre-sperimentale e una fase sperimentale.

Nella fase pre-sperimentale si è proceduto a creare una selezione di bovine al fine di ottenere un gruppo di studio omogeneo sulla base dei seguenti criteri:

- Assenza di patologie di carattere sistemico
- Assenza di patologie a livello di ovaie, utero e vagina
- >70 PP (Post-partum)
- Ottima anamnesi riproduttiva
- Conformazione anatomica di ovaie utero e cervice
- BCS (*Body Condition Score*)
- Temperamento
- Età (3-5 anni)

Sono state incluse nel protocollo di studio, le bovine in buono stato di salute, con una BCS superiore o uguale a 3 e con ovaie utero e cervice in posizione pelvica. Le bovine in cui si appurava

desmoressia dei legamenti propri dell'ovaio e dei legamenti larghi erano escluse dal protocollo, analogamente per le bovine irrequiete e poco tollerati alla contenzione in rastrelliera autocatturante.

Le sessioni di selezione si sono svolte a Ragusa presso una singola azienda zootecnica. Le visite cliniche aziendali sono state effettuate di concerto al veterinario aziendale ogni 15 giorni, per un totale di 8 sessioni. Ciascuna bovina è stata selezionata sulla base dei criteri sopradescritti a mezzo di un esame obiettivo generale e particolare dell'apparato riproduttore (palpazione transrettale e ultrasonografia).

La fase sperimentale è stata dedicata allo studio della perfusione del CL nel corso di un ciclo estrale. Le bovine selezionate nella fase pre-sperimentale n. 30 sono state sottoposte a esame ultrasonografico (Esaote ®My Lab Vet 30 Gold; Genoa, Italy), volto non solo a verificare la ciclicità (assenza/presenza del CL), ma anche a valutare la funzionalità del CL mediante valutazione visiva del flusso in CFM e PFM. Delle 30 bovine selezionate, 13 presentavano un CL funzionale, di diametro  $\geq 2,5$  cm rientrando nel protocollo di sincronizzazione estrale. Questo prevedeva la

somministrazione in unica sessione di una prostaglandina di sintesi, cloprostenolo (Estrotek®, Fatro). Seguiva il monitoraggio visivo delle manifestazioni estrali, due volte al giorno da parte dell'allevatore fino alla comparsa dell'estro.

Delle 13 bovine selezionate, 10 manifestavano l'estro tra le 48 e 72 ore e a partire dal 3°/4° giorno PE il corpo luteo neoformato veniva scansionato ogni 4 giorni tra le 09:30 e 11:30 e dalla stessa operatrice (Flavia Pruiti Ciarello). Durante i controlli si accertava, tra l'altro, l'emergenza della prima e della seconda ondata follicolare. Tutte le bovine esaminate manifestavano l'estro a 19/20 gg PE indicando un ciclo a 2 ondate follicolari.

Per lo studio è stato impiegato un ecografo dotato di tecnologia doppler su cui veniva montata una sonda lineare per uso endocavitario (5-7,5 MHz). Ogni sessione ecografica aveva una durata media di circa 7 minuti. Le bovine erano contenute mediante rastrelliera autocatturante in sala mungitura e contemporaneamente veniva fornito alimento appetibile al fine di minimizzare la formazione di artefatti di movimento. Dopo svuotamento dell'ampolla rettale, avendo cura di evitare l'ingresso di aria, la sonda veniva introdotta nel retto procedendo

con l'identificazione del corpo luteo tramite modalità B-Mode. Le scansioni *Doppler* sono state effettuate muovendo lentamente il trasduttore sulla superficie dell'ovaio, procedendo dal polo craniale al polo caudale fino a che non veniva visualizzata l'arteria spirale luteale (Figg. 4-5) e il massimo diametro trasverso del CL. Al fine di non alterare la distribuzione del flusso e il segnale di attenuazione, il trasduttore era tenuto a una distanza di circa 1-2 cm dal CL come precedentemente descritto (Acosta et al. 2003).

Il settaggio dell'ecografo per ciascuna sessione era costante sia in CFM (PRF, 2.1 KHz F, 5 MHz, G 70%, PRC, 3-B-A ; FP: M; PRS 4; V:  $\pm 16$  m/s) che in PFM (F 5.0 MHz; G: 70%; PRF: 2.8 KHz; PRC: 3-B-A; PRS: 4; FP: M ).

Dopo identificazione in B-mode del massimo diametro trasverso del corpo luteo, veniva attivata la funzione CFM e a seguire la funzione PFM, la finestra doppler veniva adattata alla dimensione del CL per minimizzare la dispersione del segnale. Dopo la magnificazione del flusso e in assenza di *flash artifacts* e di *blooming artifacts*, si procedeva con la registrazione di un minimo di 3 immagini e un massimo di 10 per entrambe le

modalità per ciascuna sessione .

Le registrazioni delle immagini erano rese indipendenti tra loro poichè tra una cattura di immagini e l'altra, l'ovaio veniva lasciato e ripreso per la successiva scansione. Tutte le immagini sono state trasferite in un hard disk esterno, in formato DICOM per future misurazioni. Le immagini di ciascuna sessione e di entrambe le modalità (CFM-PFM) sono state selezionate, riesaminate e analizzate da un singolo operatore (Flavia Pruiti Ciarello) sulla base dei seguenti criteri:

- Assenza di *flash artifacts* (artefatti di movimento).
- Assenza di *blooming artifacts* (CFM).
- Assenza di *aliasing artifact* (CFM)
- Massimo diametro trasversale del corpo luteo.
- Identificazione delle arterie capsulari e lobari.
- Massima presenza di segnale.
- Segnale a colore definito entro il perimetro del CL.
- Nitidezza dell'immagine
- Immagine centrata nella finestra di scansione.

Si procedeva quindi con la valutazione qualitativa della perfusione, mediante “*visual score*”.

La classificazione era effettuata sulla base di una gradazione visiva (soggettiva) delle aree perfuse, stimando la media in percentuale di tessuto luteale con presenza di segnale colore, in base al seguente criterio: grado 1: <25%; grado 2:  $\geq$ 25% a <50%; grado 3:  $\geq$ 50% a <75%; grado 4:  $\geq$ 75%, come descritto in precedenza (Bhal et al. 1999).

Le immagini precedentemente selezionate e sulle quali è stata effettuata la valutazione visiva della percentuale di tessuto luteale perfuso, sono state poi analizzate *off line* per una valutazione quantitativa (oggettiva) dell'area in pixel colorati mediante il software Digimizer vers. 4.1. (Fig. 6). Per ciascuna immagine è stata calcolata l'area in cm<sup>2</sup> di pixel del corpo luteo in sezione trasversale. Per il corpo luteo cavitario, l'area della rispettiva cavità è stata misurata separatamente, e poi sottratta all'area totale del CL per ottenere la RACL (area reale del corpo luteo), come descritto in precedenza (Acosta et al. 2003; 2004). Tutte le misurazioni sono state registrate per procedere poi con i calcoli statistici.

## STATISTICA

---

Dopo aver verificato la normalità dei dati, si è proceduto alla verifica della ripetibilità dell'esame mediante un test di esclusione di misure (t-Student). Ciascun valore ottenuto è stato confrontato con la media e la varianza dei valori ottenuti nelle altre ripetizioni.

Un test Anova ad una via è stato utilizzato per verificare la variabilità individuale, da bovina a bovina. Per confrontare le medie per ciascun parametro rilevato (RACL, CFM, PFM, *visual score* CFM, *visual score* PFM) nei vari giorni del ciclo, si è utilizzato il test di Student *unpaired* per il confronto di due medie. La significatività è stata settata a valori di 0,05.



## RISULTATI

---

Sono stati analizzate 388 scansioni di corpi lutei in 10 bovine in varie fasi del ciclo sessuale, di cui 209 in CFM e 179 in PFM. Per ogni bovina sono state condotte 5 sessioni in differenti periodi del ciclo estrale. Ogni sessione prevedeva da 3 a 10 scansioni. Per effettuare una singola scansione l'operatore impiegava un minuto circa.

Per prima cosa si è voluto valutare se ripetendo l'esame più volte, nella stessa bovina, lo stesso giorno e con lo stesso operatore, i valori ottenuti fossero tra loro concordanti o se c'è il rischio che una singola scansione sovrastimi o sottostimi il flusso in maniera significativa. Per fare ciò, dopo aver verificato la distribuzione normale dei dati si procedeva, come detto, ad un test di Student a due vie.

Sono stati ottenuti valori discordanti durante la misurazione del RACL in 2 occasioni in CFM, in 1 sola occasione in PFM.

La buona concordanza delle misure ha consentito di raggruppare i dati per sessione con media aritmetica e deviazione standard,

per un solo caso si è utilizzata la mediana e l'errore standard in quanto i valori non erano distribuiti normalmente (tabella 1).

Per volere testare l'effetto bovina (variabilità individuale), si sono confrontati i rilievi effettuati in tutte le bovine a parità di giorni PE. In altre parole con quest'analisi si è inteso caratterizzare l'area del corpo luteo ed il flusso ematico solo in funzione del giorno del ciclo. Alloscopo è stato impiegato un test ANOVA ad una via.

La RACL valutata in CFM ed in PFM è stata qui considerata insieme. Si è evidenziato un effetto bovina ( $P=0,00$ ) per la RACL calcolata a 3-4 giorni (Fig. 7), a 15-16 giorni (Fig. 8). A 7-8 (Fig. 9), 11-12 giorni (Fig.10) e a 19-20 giorni i CL raggiungevano invece dimensioni comparabili ( $P=0,75$ ) in tutte le bovine esaminate. Analizzando l'effetto bovina in CFM si è notato che a 3-4 giorni (Fig. 11) c'era differenza significativa ( $P=0,00$ ), con flussi più marcati in termini di area nelle bovine con corpi lutei più grandi (5, 6, 8), altra differenza si notava anche qui a 15-16 giorni. Non c'era differenza statistica ( $P=0,75$ ) anche in questo caso a 7-8 (Fig. 12), a 11-12 e a 19-20 giorni.

Analizzando l'effetto bovina in PFM si è notato che a 3-4 giorni (Fig. 13) non c'era invece differenza significativa ( $P=0,75$ ), ma i flussi più marcati in termini di area si avevano nelle bovine con corpi lutei più grandi (5, 6, 8), ma non c'era anche a 7-8 giorni ( $P=0,76$ ), a 11-12 giorni ( $P=0,80$ ) e a 19-20 giorni ( $P=0,75$ ), mentre c'era un effetto bovina ( $P=0,00$ ) a 15-16 giorni (Fig.14).

Per confermare l'ipotesi che l'area di flusso rilevata è correlata alle dimensioni del corpo luteo, è stata analizzata l'area percentuale di flusso in CFM, ottenuta dal rapporto tra la l'area di flusso e la RACL ricavata dalla stessa scansione.

LA CFM% è risultata dipendente anch'essa da un effetto bovina a 3-4 giorni ( $P=0,00$ ), anche a 7-8 giorni ( $P=0,00$ ) e a 15-16 giorni ( $P=0,00$ ), mentre non c'era differenza significativa a 11-12 giorni e a 19-20 giorni ( $P=0,75$ ). Analizzando la PFM%, non si notava effetto bovina a 3-4 giorni ( $P=0,75$ ), a 7-8 giorni ( $P=0,75$ ), a 11-12 giorni ( $P=0,81$ ), a 19-20 giorni ( $P=0,75$ ), mentre c'era effetto bovina a 15-16 giorni ( $P=0,00$ ). Analizzando il *visual score* in CFM non si notava effetto bovina a 3-4 giorni, a 7-8 giorni, a 19-20 giorni ( $P=0,75$ ), ma c'era a 11-12 giorni e a 15-16 giorni ( $P=0,00$ ). Analizzando il *visual score* in PFM non si

notava effetto bovina a 3-4 giorni, a 7-8 giorni, a 11-12 giorni, a 19-20 giorni ( $P=0,75$ ), ma rimaneva a 15-16 giorni ( $P=0,00$ ). Nella tabella n° 2 sono stati semplificati i dati, riportando in rosso le medie che risentivano dell'effetto bovina.

Per confrontare le medie per ciascun parametro rilevato (RACL, CFM, PFM, *visual score* CFM, *visual score* PFM) nei vari giorni del ciclo, si è utilizzato il test di Student *unpaired* per il confronto di due medie e due deviazioni standard.

Da quest'analisi si è evidenziato che la RACL (Grafico 1) era significativamente non distinguibile (a) in un corpo luteo in formazione ed in regressione, mentre cresceva significativamente fino a 11-12 giorni e cominciava a decrescere a 15-16 giorni.

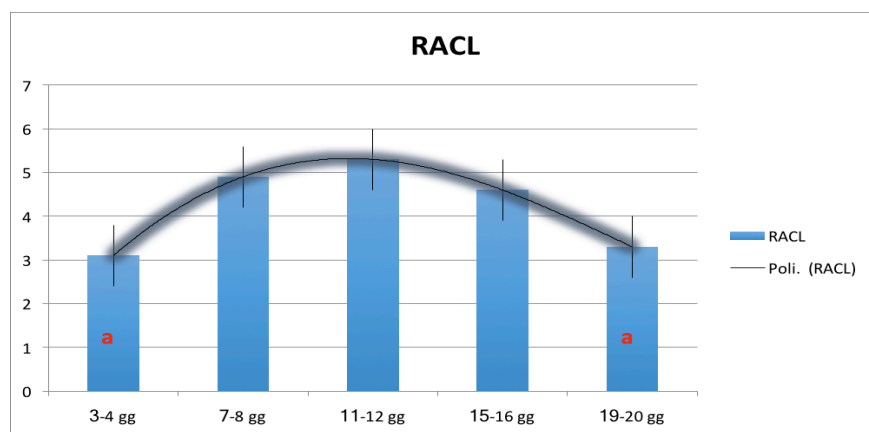


Grafico 1: Andamento della RACL (rea reale del CL priva di eventuale cavità) nel corso di un ciclo estrale. Le lettere uguali indicano le differenze non significative.

Analizzando il CFM (Grafico 2, Tavola n°1) come area perfusa e attraverso il *visual score* (rapportato in cm<sup>2</sup>), si evidenziava come la seconda tecnica magnificava i valori del flusso pur mantenendo lo stesso andamento e le stesse significatività. I flussi a 11-12 giorni e a 15-16 giorni non erano differenti statisticamente ( $p>0,05$ ).

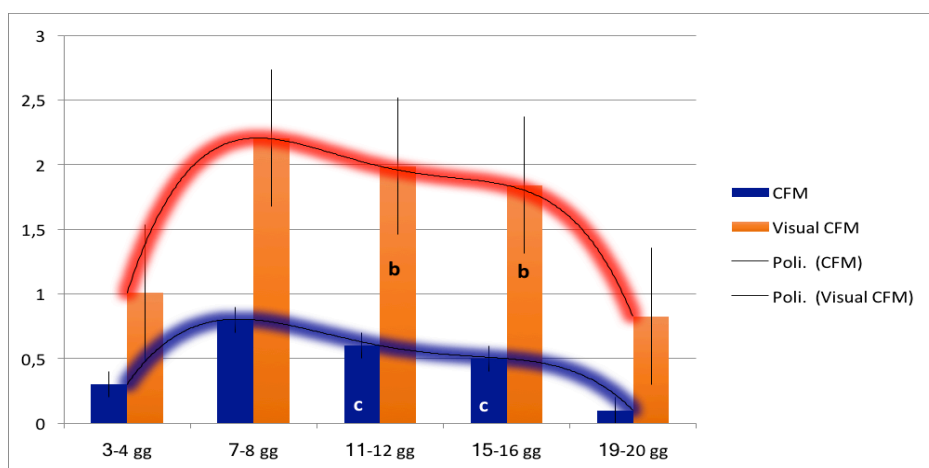


Grafico 2: Analisi del CFM (cm<sup>2</sup>) mediante *visual score*. Le lettere uguali indicano differenze non significative.

Analizzando il PFM (Grafico 3, Tavola n°1) come area perfusa e attraverso il *visual score* (rapportato in cm<sup>2</sup>), si evidenziava, anche qui, come il *visual score* magnificava i valori del flusso enfatizzando un aumento di flusso a 7-8 giorni che invece non

risultava significativo in PFM. I flussi a 7-8 gg, 11-12gg e 15-16 gg non erano differenti statisticamente ( $p>0,05$ ).

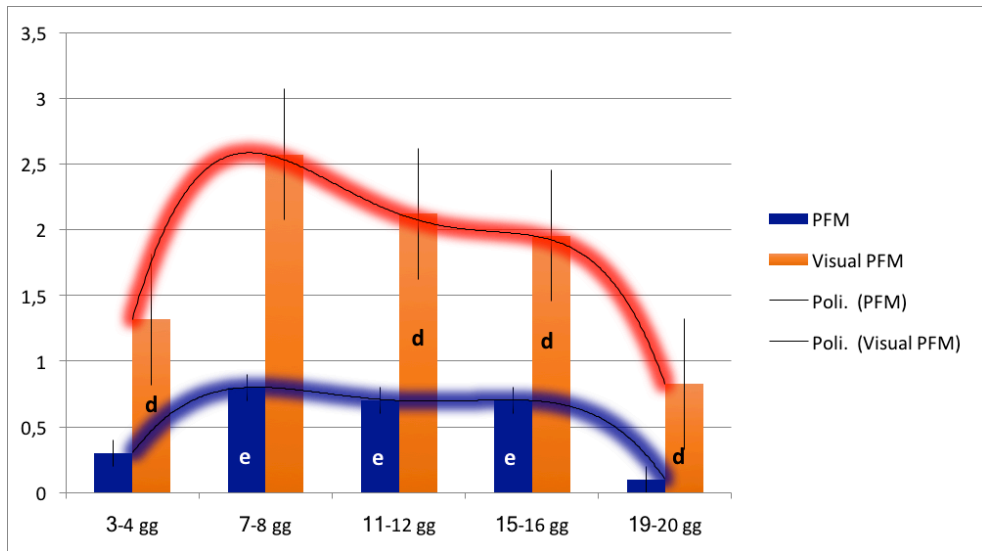
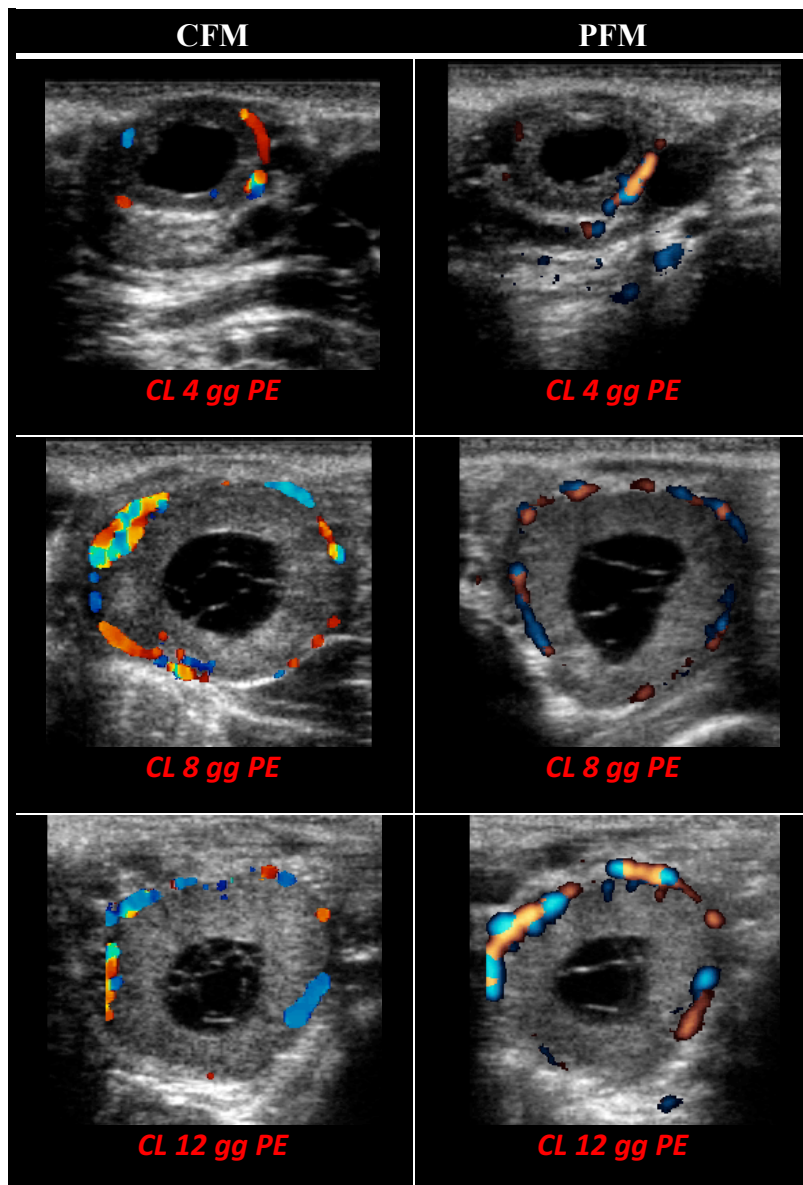
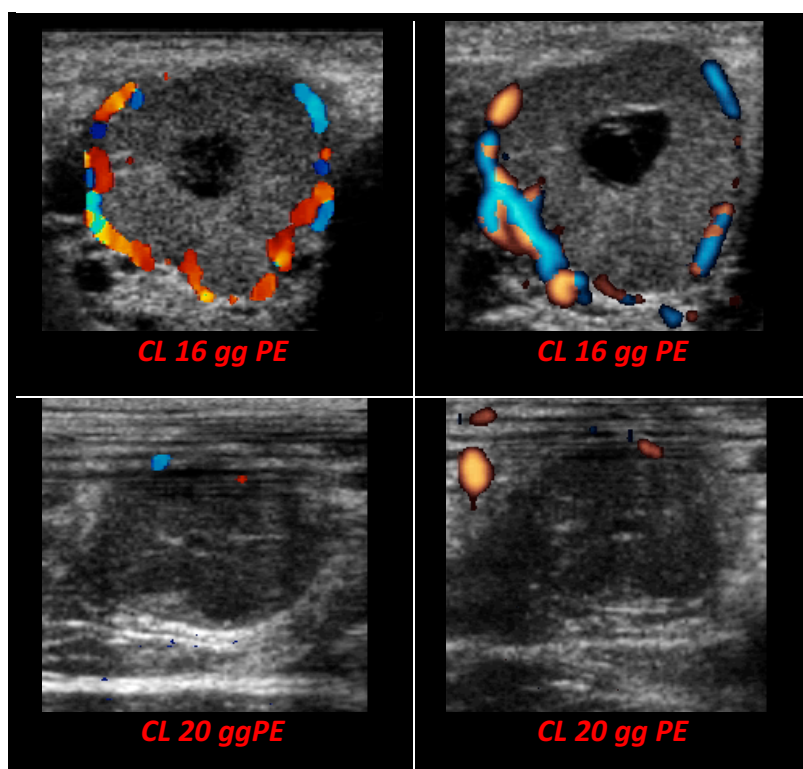


Grafico 3: Analisi del PFM (cm<sup>2</sup>) mediante *visual score*. Le lettere uguali indicano differenze non significative.





Tav. 1: Evoluzione dell'LBF nel corso di un ciclo estrale in CFM e PFM.



## DISCUSSIONE

---

Questo studio ha analizzato l'area del CL e l'evoluzione della sua perfusione nel corso di un ciclo estrale in bovine da latte, selezionate per programmi di ET, al fine di trarne elementi predittivi che possano migliorare le fasi di selezione della bovina donatrice e ricevente.

L'ecografia Doppler è una tecnica che richiede delle macchine ecografiche performanti ed un certo livello di addestramento dell'operatore, tuttavia è una tecnica rapida (meno di 1 minuto) che restituisce informazioni importanti circa lo stato funzionale del corpo luteo.

In questo studio è stato verificato che la tecnica è affidabile e ripetibile. Per fare ciò, sono state realizzate un numero di variabile di misurazioni (3-10) sullo stesso CL, nella stessa bovina, nello stesso giorno e nella stessa ora e confrontate statisticamente. Il numero di misurazioni non è stato uguale per tutte le bovine in quanto dipendente dalle condizioni operative di campo. Le principali condizioni che limitavano l'esame ecografico erano rappresentate dai movimenti della bovina, dall'indole, dall'età e dalla conformazione

anatomica di utero e ovaie. Infatti risultava essere più difficile eseguire l'esame ecografico nelle bovine più giovani in quanto più irrequiete, rispetto alle bovine più adulte rendendo talvolta impossibile l'esecuzione dell'esame ecografico. Lo scopo di ciascuna sessione ecografica era quello di ottenere delle scansioni indipendenti le une dalle altre. Infatti l'identificazione, palpazione e ricognizione dell'orientamento topografico del CL era effettuata di volta in volta per ciascuna scansione.

I risultati ottenuti hanno indicato che una singola scansione può essere sufficiente sia per la valutazione della perfusione luteale (CFM; PFM) che per la dimensione del CL.

L'effetto operatore in questo studio non è stato valutato, tuttavia riteniamo che sia presente e che sia legato essenzialmente alla capacità di settaggio della macchina e al non riconoscimento degli artefatti. Solo una tecnica appropriata e standardizzata rende ripetibile l'esame.

Il settaggio della macchina ecografica è stato effettuato tenendo conto dell'anatomia vascolare del CL. La valutazione dei flussi a bassa velocità è resa possibile con la tecnica doppler sia in modalità CFM che In PFM

impiegando bassi valori di PRF. Nel nostro studio il PRF è stato impostato a un valore pari a 2,1 KHz per la modalità CFM e paria a 2,8 KHz per la modalità PFM. I valori di PRF in PFM si discostano da quelli impiegati in letteratura e con la stessa macchina, dove sono stati impiegati valori più bassi, pari a 1,4 KHz (Pugliesi et al. 2014; Kanazawa et al. 2016). Tuttavia nel nostro studio è stato notato che, se l'obiettivo era quello di valutare la perfusione del tessuto luteale, valori al di sotto di 2,1 KHz in CFM davano origine all'*aliasing artifact*, che si caratterizza per la trasduzione del *doppler shift* sullo schermo in una mappa di colori ultrabrillante, disordinata e debordante il perimetro del CL, rischiando pertanto una sovrastima del segnale. Impiegando invece valori al di sotto di 2.8 in PFM, le scansioni erano maggiormente soggette a *flash artifact*.

Lo svuotamento dell'ampolla rettale è stato eseguito in modo sistematico, avendo cura di evitare l'introduzione di aria poiché, la presenza della stessa determina la distensione dell'ampolla rettale, rendendo pertanto impossibile un'adeguata identificazione e palpazione dell'ovaio. Inoltre l'interposizione di aria tra il trasduttore e la mucosa del

retto, aumenta il segnale di attenuazione interferendo con il rilievo dei flussi anche più superficiali.

La corretta identificazione dell'ovaio e delle sue strutture e la percezione dell'orientamento anatomico (identificazione del mesovario e del legamento proprio dell'ovaio) è risultato essere di fondamentale importanza per l'individuazione del CL dell'arteria spirale luteale (ASL). L'identificazione del piano di scansione, è risultato essere semplice se favorito dalla presenza di un CL cavitario, in assenza di cavità risulta essere difficile identificare il polo craniale e/o caudale. Tuttavia l'identificazione dell'ASL del CL, potrebbe essere impiegata in futuro per la standardizzazione della tecnica. In altri studi (Kanazawa et al. 2016; 2017). L' ASL è stata studiata per la valutazione quantitativa del flusso mediante calcolo di indici indiretti come il TAMV (*Time Average Medium Velocity*) in modalità CFM. L'identificazione dell'ASL è facilitata dall'orientamento della sonda lungo l'asse longitudinale dell'ovaio, prendendo come punto di riferimento il mesovario e il legamento proprio dell'ovaio (Kanazawa et al. 2017). Come mostrato da Yamada et al. (1995), l'ASL topograficamente si inserisce alla base del

CL pertanto, se il piano di scansione risulta essere adiacente all'ilo del CL, in corrispondenza dell'ingresso dell'ASL, si rischia una sovrastima del flusso, se invece risulta essere distante dall'ilo si rischia una sottostima (Fig. 17). Inoltre l'identificazione della stessa consente di affinare la valutazione clinica di giovani CL di 3-4. Infatti, in questa fase, non si rileva flusso nelle arterie capsulari o, se presente, risulta essere minimo; quindi l'identificazione dell'ASL, in questa fase, potrebbe facilitare il rilievo di un CL in formazione. Nel nostro studio la stima della perfusione luteale è stata eseguita assumendo che il punto di ingresso dell'ASL fosse il polo caudale.

L'identificazione dell'ASL consente di migliorare la stima della perfusione luteale, poiché consente all'operatore di poter interpretare le scansioni sulla base di un ragionamento orientato, consentendo allo stesso di tradurre un'immagine in 2D, in una valutazione tridimensionale. In futuro potrebbe essere interessante capire quale sia la dinamica dell'evoluzione di tale arteria. Poiché la presenza della stessa è indice di attività vascolare in un CL in fase di crescita (Fig.15) e in un CL maturo (Kanazawa et al. 2016;

2017) e dato che il limite della tecnologia doppler sia in CFM che PFM è quello di non poter discernere un CL a 4 gg da uno in fase di piena regressione di 19-20 gg, potrebbe essere interessante capire se in un CL in regressione l'ASL sia ancora presente o meno e soprattutto che caratteristiche abbia.

L'ecografia doppler consente di rilevare i flussi presenti nei plessi capillari superficiali e periferici rappresentati dalle arterie capsulari luteali, pertanto le valutazioni siano esse oggettive che soggettive devono tenere conto che il flusso che viene valutato, corrisponde solo parzialmente al flusso reale del CL.

Dopo aver individuato e palpato l'ovaio, quest'ultimo dovrebbe essere delicatamente immobilizzato tra pollice, medio e trasduttore, avendo cura di non effettuare pressioni elevate poiché, anche una leggera pressione in corrispondenza dell'arteria ovarica e/o della capsula ghiandolare luteale, determinerebbe un'alterazione del flusso (Fig. 16), rischiando di sottostimare la percentuale di tessuto luteale perfuso.

Considerando l'anatomia vascolare del CL, caratterizzata

dalla presenza delle arterie capsulari superficiali, risulta essere intuitivo capire come anche una leggera pressione possa determinare il collasso di capillari, facendo pertanto scomparire un flusso che in realtà è esistente (Fig. 16), e che pertanto non viene rilevato. Come suggerito in altri studi (Acosta et al. 2003) il trasduttore dovrebbe essere distante circa 2 cm dal CL.

La variabilità riscontrata in termini di conformazione anatomica di utero e ovaie, è un altro limite in termini di facilità di esecuzione dell'esame; poiché la presenza di un utero in posizione declive con corna in posizione ante – pubica e contemporanea presenza di lassità dei legamenti, comportava una maggiore mobilità dell'ovaio, maggiormente soggetto ai movimenti passivi indotti dalla fisiologica peristalsi intestinale.

Se ben eseguita, la valutazione della perfusione luteale si configura come un indice più sensibile e più accurato della funzionalità del CL, rispetto a quelli attualmente in uso come dimensione, ecogenicità e consistenza (Herzorg et al. 2010). La possibilità di valutare la funzionalità del CL con

una singola scansione potrebbe coadiuvare in campo le valutazioni cliniche del buiatra.

Nel nostro studio, abbiamo valutato, inoltre, se nella stima delle dimensioni del CL e del flusso è presente un effetto bovina, ossia una variabilità individuale.

Nella valutazione dell'area del CL (RACL), è stata dimostrata una certa individualità di risposta dell'organo agli eventi di luteogenesi (3-4 giorni) e luteolisi (15-16 giorni). Un effetto bovina simile è stato osservato in CFM, mentre si riduceva in PFM.

La tecnica PFM è risultata più adatta ad estrapolare i valori indicativi di vascolarizzazione nelle bovine studiate. Tuttavia, anche in PFM si confermava una certa variabilità individuale nella fase di regressione luteale (15-16 gg PE).

Un'ipotesi che sembrava emergere dallo studio dell'effetto bovina in RACL e CFM era che i corpi lutei più grandi avessero un flusso maggiore. L'area di flusso ematico più marcata per CL di dimensioni maggiori potrebbe essere giustificata dall'anatomia vascolare del CL. In CL più grandi, probabilmente il diametro dell'arteria spirale luteale e il numero delle arterie capsulari e lobari è maggiore, e



considerando che la modalità CFM tiene conto della direzione del flusso e della velocità, è probabile che l'area dei pixel colorati rilevata, sia l'effetto di leggeri *aliasing artifact* in CFM che tendono a sovrastimare il flusso (limite della tecnica). Pertanto in questa fase la magnificazione del flusso è maggiore in CFM per la presenza di vasi di maggiori dimensioni e in cui si hanno flussi più veloci.

Non è un caso che questa differenza sia stata notata a 3-4 gg PO, fase iniziale di angiogenesi, e a 15-16 gg in cui si registrano picchi di flussi che potrebbero essere verosimilmente in alcuni casi associati ai picchi di flusso ematico che precedono la luteolisi (Acosta et al. 2004; Shirasuna et al. 2004; Miyamoto et al., 2005, 2006). Secondo un altro studio, i rilievi di flussi maggiori in fase di regressione luteale potrebbero essere giustificati da un'importante anastomosi artero-venosa che precede la cascata luteolitica (Nio-Kobayashi et al. 2016). L'assenza dell'effetto bovina ( $P=0,75$ ), in fase di crescita luteale statica (da 7-8, a 11-12 gg), può essere giustificata, dall'istaurarsi di una vascolarizzazione tipica di un CL

matturo con presenza dell'ASL e sue diramazioni (arterie capsulari e lobari).

Se tale ipotesi fosse stata corretta avrebbe avuto più senso esprimere i valori di flussi in termini di area percentuale. Poiché l'effetto bovina aumentava utilizzando le aree percentuali, ci sentiamo di escludere l'ipotesi e riteniamo corretto esprimere l'area di flusso in  $\text{cm}^2$ . Ci sembra meno corretto esprimere l'area vascolarizzata in pixel, perché questi risentono delle caratteristiche tecniche delle sonde, del *postprocessing* del software dell'ecografo.

Analizzando invece l'evoluzione della RACL nelle varie fasi del ciclo estrale viene ad essere confermata l'importanza della valutazione delle dimensioni del corpo luteo per distinguere quanto meno un corpo luteo in formazione o in luteolisi, da un corpo luteo funzionale. Le fasi funzionali del corpo luteo (7-16 giorni) hanno una RACL distinguibile matematicamente, ma non clinicamente, riferendosi a CL con diametro compresi tra 2 e 2,5 cm.

Diverso il profilo del flusso in CFM, dove era presente un incremento di flusso a 7-8 giorni pari a  $0,8 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ ,

dopodiché il flusso si riduceva ( $0,6\pm 0,3 \text{ cm}^2$ ) e non era distinguibile da 11 a 16 giorni. Il picco di flusso a 7-8 giorni non è stato confermato dal profilo in PFM (che riteniamo per quanto detto più accurato) dove non si evidenziava alcuna differenza tra 7 e 16 giorni.

Il *visual score* è risultata una tecnica imprecisa, in quanto sovrastima notevolmente i flussi, pur mantenendo profili paralleli al calcolo quantitativo dell'area digitale. E' un sistema rapido che in ambito clinico potrebbe avere maggiore consenso, ma ne limiteremmo l'uso alla stima di un corpo luteo funzionale rispetto ad uno in regressione/formazione, come nella diagnosi di gravidanza a 21 giorni (Utt et al. 2009; Guimaraes et al. 2013).

Volendo infine estrapolare informazioni utili per la selezione delle riceventi, lo studio ci suggerisce che una bovina da latte con ciclo regolare a 2 ondate dovrebbe avere a 7-8 giorni un CL di almeno 2 cm di diametro con un flusso calcolato in PFM di  $0,8\pm 0,3 \text{ cm}^2$ . Questo valore concorda con il *cut off* di  $0,5 \text{ cm}^2$ , descritto in letteratura come flusso ottimale per la ricevente (Kanazawa et al. 2016), rappresentando il limite minimo del range ricavato.

Anche nella selezione della donatrice è importante che la bovina prima del protocollo di superovulazione presenti un corpo luteo funzionale di 10-12 giorni. In questo studio possiamo estrapolare alcune caratteristiche di questo potenziale CL che dovrebbe avere un diametro di 2-2,5 cm ed un flusso di  $0,7 \pm 0,4 \text{ cm}^2$ .

Secondo Kanazawa et al. (2016) una ricevente con un CL con area perfusa di  $0,8 \text{ cm}^2$  a 14 giorni può considerarsi gravida o meglio non sicuramente vuota. Nel nostro studio i flussi a 11-12 giorni non differiscono da quelli a 15-16 giorni, un periodo in cui la luteolisi potrebbe essere già innescata, includendo valori anche di  $0,8 \text{ cm}^2$ .

Attualmente questi parametri sono utilizzati dal nostro gruppo raccolta embrioni per la selezione di riceventi e donatrici. I primi risultati sembrano confermare la bontà di questo criterio di scelta.

La titolazione del P4, come *gold standard* di funzionalità luteale, non è stata prevista nel nostro studio, in quanto da noi considerato non solo dispendioso in termini economici, ma anche ripetitivo data la presenza di una discreta letteratura che ha già dimostrato ampiamente la

correlazione positiva dei livelli di P4 con il LBF (Herzog et al. 2010; Bollwein et al. 2013; Kaya et al. 2016).

Il Doppler è una tecnica mininvasiva, veloce e per certi aspetti economica che viene riconfermata utile a caratterizzare la funzionalità del corpo luteo e il suo potenziale endocrino.

## BIBLIOGRAFIA

---

Acosta T.J., Yoshizawa N., Ohtani M., Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and mid cycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol. Reprod.* 2002, 66, 651–658.

Acosta T.J., Hayashi K.G., Ohtani M., Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003, 125, 759-767.

Acosta T.J., Miyamoto A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* 2004, 82-83, 127-140.

Battocchio M., Gabai G., Mollo A., Veronesi M.C., Soldano F., Bono G., Cairoli F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 1999, 51, 1059-1069.

Baracaldo M.I., Martinez M.F., Adams G.P., Mapletoft R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000, 53, 1239-1250 .

Bhal P.S., Pugh N.D., Chui D.K., Gregory L., Walker S.M. and Sha R.W. The use of transvaginal power Doppler ultrasonography to evaluate the relationship between perifollicular vascularity outcome in in-vitro fertilization treatment cycles. *Hum. Reprod.* 1999, 14 , 939-945.

Bicalho R.C., Galvao K.N., Guard C.L., Santos J.E.P. Optimizing the accuracy of detecting a functional corpus luteum in dairy cows. *Theriogenology* 2008, 70, 199-207.

Bò G.A., Guerrero D.C., Adams G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* 2008, 69, 81-87.

Bollwein H. Effect of oxytocin infusion on luteal blood flow and progesterone secretion in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 2012,

13, 67-71.

Bollwein H., Baumgartner U., Stolla R. Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow in cows during pregnancy. *Theriogenology* 2002, 57,2053–2061.

Bollwein H., Lüttgenau J., Herzog K. Bovine luteal blood flow: basic mechanism and clinical relevance. *Reprod., Fertil. Develop.* 2013, 25, 71-79.

Bollwein H., Heppelmann M., Lüttgenau, J. Ultrasonographic doppler use for female reproduction management. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2016, 32, 149-164.

Brozos C.N., Pancarci M.S., Valencia J., Beindorff N., Tsousis G., Kiossis E. Bowelling H. Effect of oxytocin infusion on luteal blood flow and progesterone secretion in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* 2012 13, 67-71.

Des Coteaux L., Gnemmi G., Colloton J. Practical atlas of



ruminant and camelid reproductive ultrasonography . 2010  
Blackwell Publishing, Pg 42-48.

Ferreira J.C., Ignácio F.S., de Meira C. Doppler echography  
principles and methods of evaluation of the reproductive  
tract in mares. *Acta Sci. Vet.* 2011, 39, 105 -111.

Findllay, J.X. Angiogenesis in reproductive tissues. *J.*  
*Endocrinol.* 111, 357-366.

Gastal E.L., Gastal M.O., Ginther O.J. Relationships of  
changes in B-mode echotexture and colour-Doppler signals  
in the wall of the preovulatory follicle to changes in  
systemic oestradiol concentrations and the effects of human  
chorionic gonadotrophin in mares. *Reproduction.* 2006, 131,  
699-709.

Ghetti A.M., Siqueira L.G.B., Areas V.S., Arashiro E.K.N.,  
Fernandes C.A.C., Palhao M.P., Viana J.H.M.. Comparison  
of objective and subjective methods for evaluating the

vascular pattern of the preovulatory follicle using color Doppler. *Anim. Reprod.*, 2012, 9, 657.

Ginther O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction: color-doppler ultrasonography. Cross Plains: Equiservices Publishing. 2007, 258p.

Ginther O.J., Utt M. D. Doppler ultrasound in equine reproduction: principles, techniques, and potential. *J. Equine Vet. Sci.* 2004, 24, 516-526.

Guimaraes C.R, Oliveira M.E, Rossi J.R, Fernandes C.A, Viana J.H, Palhao M.P. Corpus luteum blood flow evaluation on day 21 to improve the management of embryo recipient herds. *Theriogenology*. 2015,15, 237-241.

Guarneri P. Embryo transfer: stato dell'arte e prospettive. In Sali G. Gestione della riproduzione bovina; Point Veterinaire Italie. 2013.

Hanzen C., Pieterse M., Scenczi O. Drost M. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum . Vet. J. 2000, 159,161-170.

Herzog K. and Bollwein H. application of Doppler ultrasonography in cattle reproduction. Reprod. Dom. Anim. 2007, 42 suppl, 51–58.

Herzog K., Brockhan-Ludemann M., Kaske M., Beindorff N., Paul V., Niemann H., Bollwein H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. Theriogenology 2010, 73, 691-697.

Herzog H, Voss C, Kastelic JP, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bolwein H. Luteal blood flow increases during the first three weeks of pregnancy in lactating dairy cows. Theriogenology 2011, 75, 549–554.

Hirayama H. Naito, S. Fukuda A, Fujii T, Asada M., Inaba Y, Takedomi T., Kawamata M., Moriyasu S., Kageyama S. Long-term changes in plasma anti-mullerian hormone concentration and the relationship with superovulatory response in Japanese black cattle. *J. Reprod. Dev.* 2017, 63, 95-100.

Kayacik V., SalmanođLu M. R. B. Polat, A. Özlüer . Evaluation of the corpus luteum size throughout the cycle by ultrasonography and progesterone assay in cows. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2005, 29, 1311-1316.

Kanazawa T., Seki M., Ishiyama K., Kubo T., Kaneda Y., Sakaguchi M., Izaike Y., Takahashi T. Pregnancy prediction on the day of embryo transfer (Day 7) and Day 14 by measuring luteal blood flow in dairy cows. *Theriogenology.* 2016, 30, 1-9.

Kanazawa T., Seki Mishiyama K., Araseki M., Izaike Y. Takahashi T. Administration of gonadotropin-releasing

hormone agonist on Day 5 increases luteal blood flow and improves pregnancy prediction accuracy on Day 14 in recipient Holstein cows. *J. Reprod. Dev.* 2017 63, 389–399.

Kelley D.E., Galvao K.N., Mortensen C.J., Risco C.A. and Ealy A.D. Using Doppler ultrasonography on day 34 of pregnancy to predict pregnancy loss in lactating dairy cattle. 2017 *J. Dairy Sci.* 100, 1-6.

Koenig, H. E., W. Amselgruber: Vaskularisation des Corpus luteum des Rindes. *Fertilitaè* 19862, 205 -208.

Kudlač, E.,J. Konečný, J. Čermak. Progesterone concentrations in milk of superovulated cows. *Acta. Vet. Brno* 1991, 60, 171-179.

Luttgenau J., Bollwein H. Evaluation of bovine luteal blood flow by using color Doppler ultrasonography *Reprod. Biol.* 2014, 14, 103-109.

Mc Dougall S., Rhodes F.M. Detection of a corpus luteum

in apparently anoestrous cows by manual palpation, transrectal ultrasonography and plasma progesterone concentration; N. Z. Vet. J. 1999, 47, 42-57.

Matsui M. and Miyamoto A. Evaluation of ovarian blood flow by colour Doppler ultrasound: Practical use for reproductive management in the cow. Vet. J. 2009, 181, 232-240.

Miyamoto A., Shirasuna K., Wijayagunawardane M.P.B., Watanabe S., Hayashi M., Yamamoto D., Matsui M. , Acosta T.J.. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. Dom. Anim. Endocrinol. 2005, 29, 329-339.

Miyamoto A.K. Shirasuna, K. Hayashi, D. Kamada, C. Kawashima, E. Kaneko, T. J. Acosta M. Matsui. A. potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. J. Reprod. Dev. 2006, 52, 153-160.

Miyamoto A., Shirasuna K., Sasahara K. Local regulation of corpus luteum development and regression in the cow: Impact of angiogenic and vasoactive factors. *Dom. Animal. Endocrinol.*, 2009, 37, 159–169.

Myron A., Pozniak P., Allan L. *Clinical doppler ultrasound: expert consult*. Churchill Livingstone Elsevier. 2014, 1-20.

Nio-Kobayashi J., Miyazaki K., Hashiba K., Okuda K. Iwanaga T. Histological analysis of arteriovenous anastomosis-like vessels established in the corpus luteum of cows during luteolysis. *J. Ovarian Res.*, 2016, 9-67.

Niswendel GD., Juengel .J.L., Silva P J, Rollyson M, K., Mcintosh E. W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiol. Rev.*, 2000, 80, 1-29.

Pieterse M.C., Taverne M. A.M., Kruip, Th. A.M. Willemse A.H. Detection of corpora lutea and follicles in cows: a comparison of transvaginal ultrasonography rectal

palpation. *Vet. Rec.* 1990 126, 552–4.

Pinaffi-F. L.V.; Santos; E. S.; Da Silva-M G; Filho-M. M.;  
Madureira E. H.; Silva L.A. Follicle and corpus luteum size  
and vascularity as predictors of fertility at the time of  
artificial insemination and embryo transfer in beef cattle,  
*Pesq. Vet. Bras.* 2015, 736, 1678-5150.

Pugliesi G., Miagawa B. T., Paiva Y.N., França M.R., Silva  
L.A., Binelli M. Conceptus-induced changes in the gene  
expression of blood immune cells and the ultrasound-  
accessed luteal function in beef cattle: how early can we  
detect pregnancy?. *Biol. Reprod.* 2014, 91, 4-12.

Reynolds L.P., Grazul-Bilska A. T., Redmer Dale A.  
Angiogenesis in the Corpus Luteum. *Endocrine* 2000, 12, 1-  
9.

Russo M, Vecchio D, Neglia G, Pacelli C, Prandi A,  
Gasparrini B, Zicarelli L, D'Occhio MJ, Campanile G.  
Corpus luteum function and pregnancy outcome



in buffaloes during the transition period from breeding to non-breeding season. *Reprod Domest Anim.* 2010, 45, 988-991.

Scully S., Evans A.C.O., Carter F., Duffy P., Lonergan P., Crowe M.A. Ultrasound monitoring of blood flow and echotexture of the corpus luteum and uterus during early pregnancy of beef heifers *Theriogenology*, 2015, 201, 449–458.

Shirasuna K., Wijayagunawardane M.P.B., Watanabe S., Yamamoto D., Matsui M., Ohtani M., A blood flow in the corpus luteum acutely increases together with endothelin1 mRNA expression at early stage of regression during spontaneous luteolysis in the cow. *Biol Reprod.* 2004, 71, 137-149.

Siqueira L.G.B., Areas V.S., Ghetti A.M., Fonseca J.F, Palhao M.P., Fernandes C.A.C., Viana J.H.M. 2013. Color Doppler flow imaging for the early detection of nonpregnant cattle at 20 days after timed artificial insemination. *J. Dairy Sci.* 2013, 96, 6461-6472.

Singh J., Dominguez M., Jaiswal R., Adams G.P., A simple ultrasound test to predict the super stimulatory response in cattle. *Theriogenology*, 2004, 62, 227–243.

Tamboora D., Kupin D., Sumande J. Superovulation in cows: a relationship between progesterone secretion before ovulation and the quality of embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 1985, 8, 327-334.

Trevisol E., Ferreira J.C., Ackermann C.L., Destro F.C., Marques Filho W.C., Carmagos A.S., Biehl M.V., Amaral J.B., de Figueiredo Pantoja J.C., Sartori R., Ferreira J.C. Luteal changes after treatment with sub-luteolytic doses of prostaglandin (cloprostenol sodium) in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 2015, 153, 8-12.

Utt M.D., Johnson III G.L., Beal W.E.. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. *Theriogenology* 2009, 71, 707–715 .

Viana J.H.M., Arashiro E.K.N., Siqueira L.G.B., Ghetti A.M., Areas V.S., Guimarães C.R.B., Palhao M.P., Camargo L.S.A., Fernandes C.A.C. Doppler ultrasonography as a tool for ovarian management. *Anim. Reprod.*, 2013, 10, 215-222.

Yamada O., Abe M., Takehana K., Iwasa K., Hiraga T., Hiratsuka T. Microvascular changes in the bovine corpus luteum during pregnancy. *J. Vet. Med. Sci.* 1995, 57, 75–79.

Wiltbank M.C., Dysko R.C., Gallagher K.P., Keyes P.L. Relationship between blood flow and steroidogenesis in the rabbit corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 1988, 84, 513–520.

Wilmut I., Rowson L.E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, 1973 30, 686-90;

Willett E., Black W., Casida L., Stone W, Buckner P. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 1951, 2, 247.

## APPENDICE I: ARTEFATTI

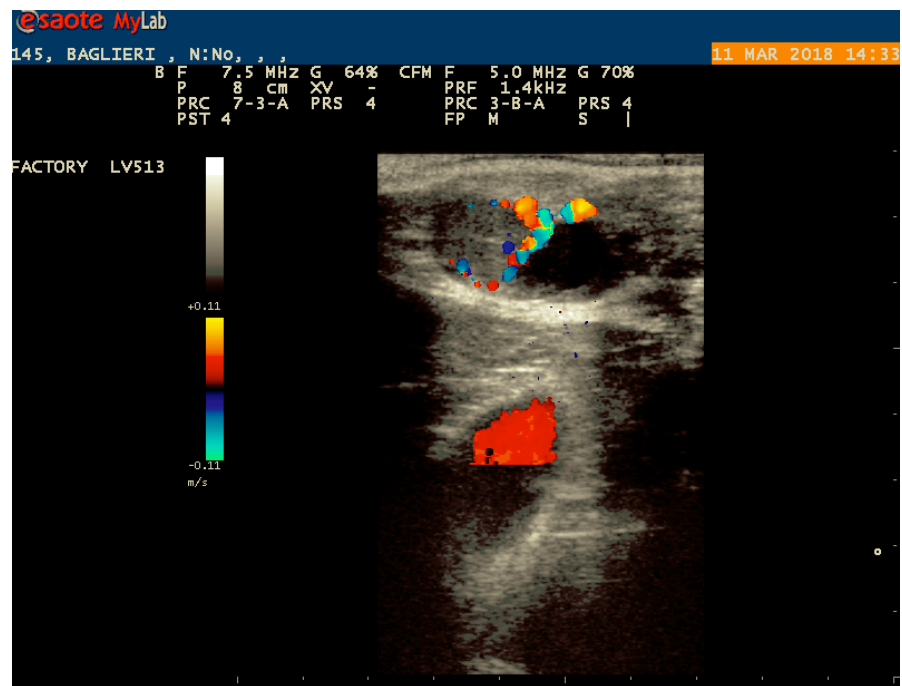


Fig. 1. *Aliasing* – PRF 1.4 KHZ Velocità 11 m/s. Fonte: File personale.

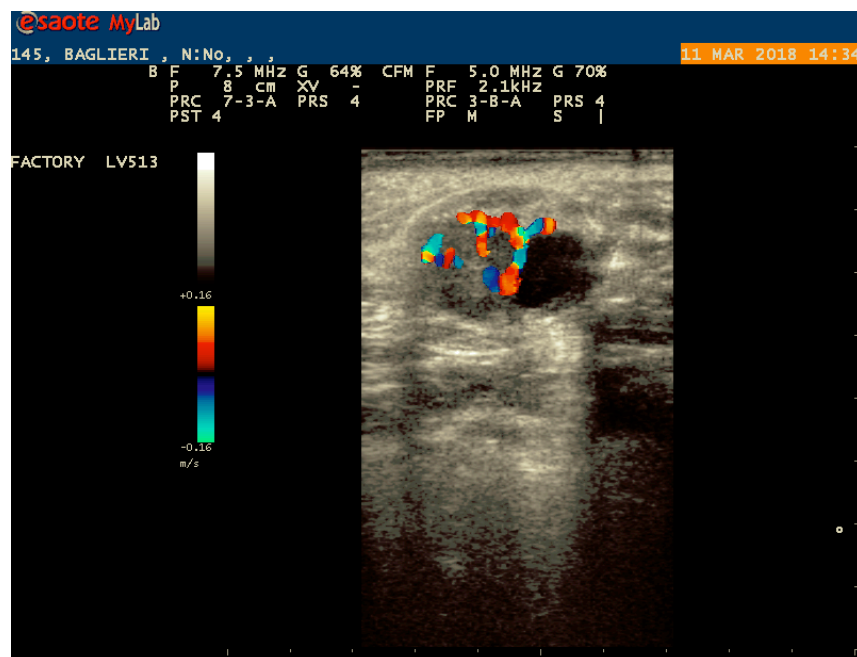


Fig. 2. *Aliasing* – correzione per aumento del PRF (2.1 KHZ) e della gamma di velocità 16 m/s. Fonte: File personale

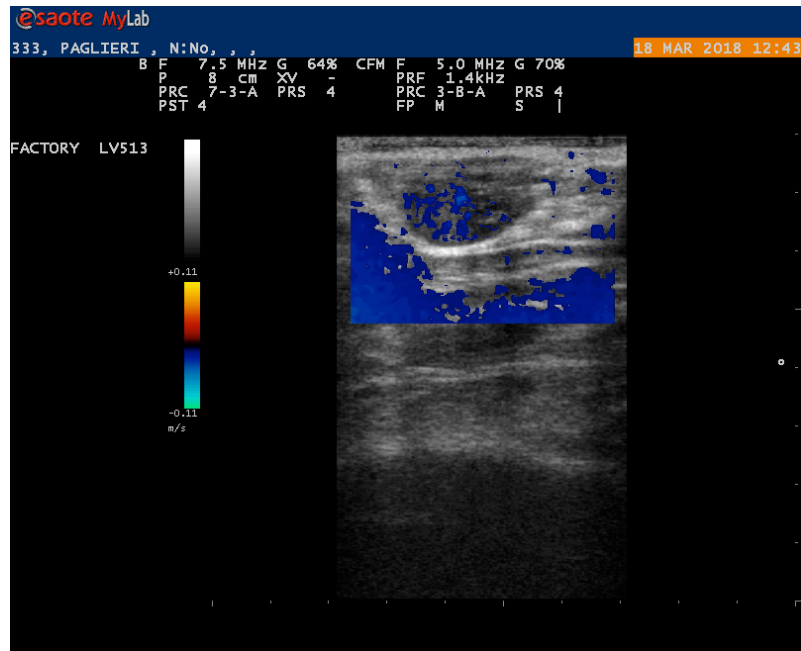
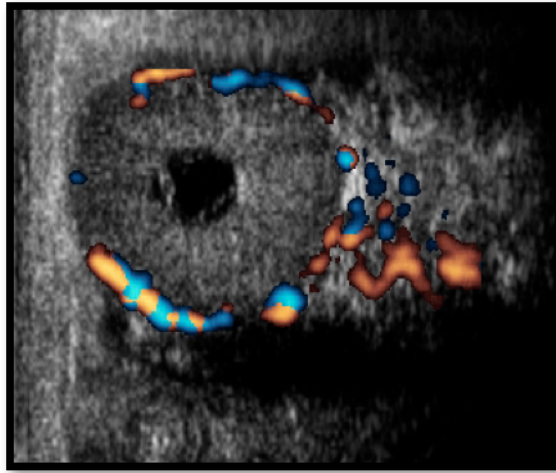


Fig. 3. *Flash artifact* PRF 1,4 KH, Velocità 11 m/s.  
Fonte: File personale.

## APPENDICE II: MATERIALI E METODI

---

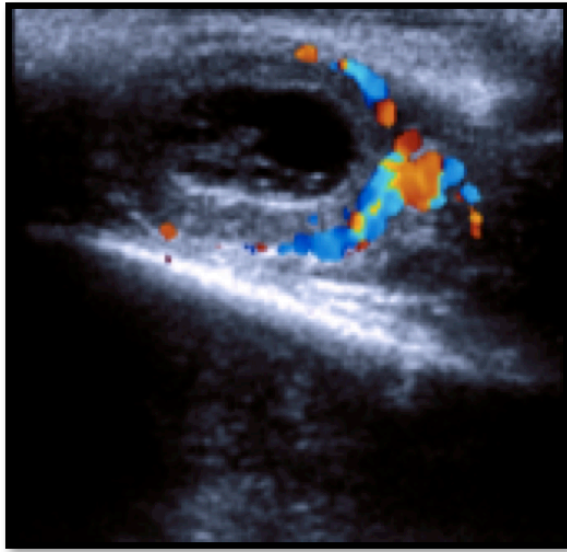


**A**

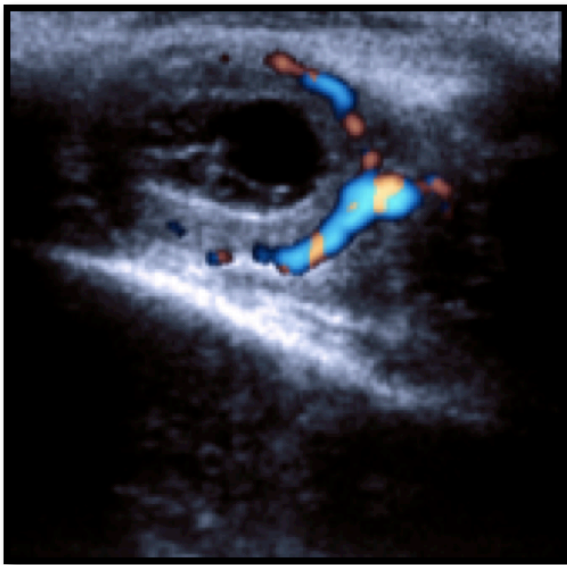


**B**

Fig. 4 - (A) Identificazione dell'arteria spirale e delle arterie capsulari del CL. CL 12 gg PE, modalità PFM (PRF 2.1, Guadagno 60%)  
Fonte: File personale. (B) Schematizzazione dell'anatomia vascolare dell'arteria spirale e delle arterie capsulari del CL (Yamada et al. 1995).



**A**



**B**

Fig. 5 - Esempio di identificazione dell'arteria spirale luteale e rilievo delle arterie capsulari in un CL 8 GG PE in modalità CFM (A) e modalità PFM (B).

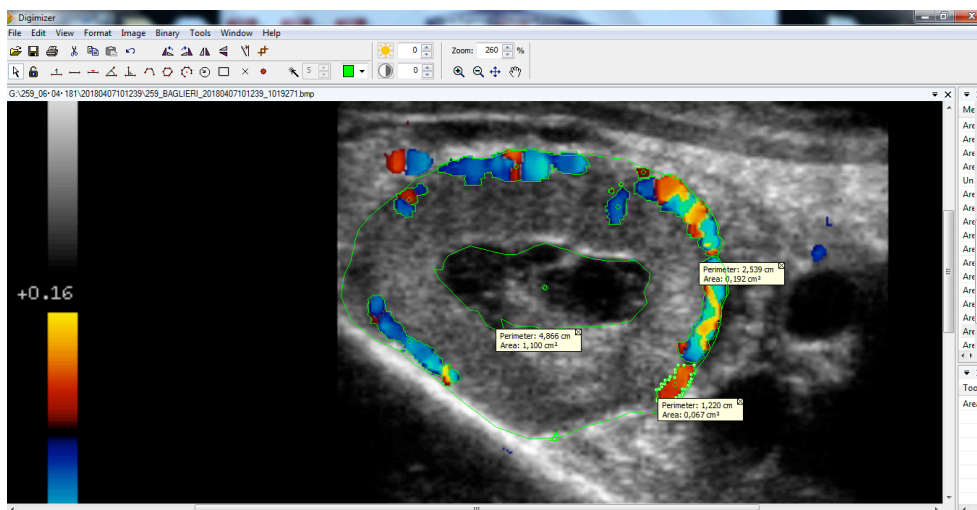


Fig. 6 - Esempio di valutazione della RAQL, e dell'area perfusa luteale in CFM. (Digimizer ver. 4.1). Fonte: File personali.



## APPENDICE III: RISULTATI

Tab.1 – Dati raggruppati per singola sessione ecografica con media aritmetica e deviazione standard, in rosso si è utilizzata la mediana e l'errore standard in quanto i dati non erano distribuiti normalmente.

bov	gg PE	RACL cm2		cm2 flow		% flow		Visual score	
		CFM ± DS	PFM ± DS	CFM ± DS	PFM ± DS	CFM ± DS	PFM ± DS	CFM	PFM
1	4,0	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	7,7 ± 3,5	3,2 ± 3,1	1,0	1,5
	8,0	5,7 ± 0,6	5,2 ± 0,3	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,3	15,9 ± 3,8	2,9 ± 7,9	1,5	2,0
	12,0	5,2 ± 0,6	5,5 ± 0,3	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	16,2 ± 4,4	2,7 ± 8,1	2,0	2,0
	16,0	5,3 ± 0,4	5,6 ± 0,5	1,2 ± 0,4	1,3 ± 0,4	23,7 ± 8,5	4,7 ± 11,5	3,0	2,5
	20,0	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,2 ± 2,1	0,9 ± 2,5	1,0	1,0
2	3,5	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	6,2 ± 3,8	3,1 ± 3,6	1,0	1,0
	7,5	4,9 ± 0,3	4,7 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	9,3 ± 3,9	4,7 ± 4,3	1,5	1,5
	11,5	4,9 ± 0,3	5,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,7	3,3 ± 1,6	0,8 ± 2,2	1,0	1,0
	15,5	4,0 ± 1,2	3,7 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	1,6 ± 1,3	1,0 ± 0,2	1,0	1,0
	19,5	2,9 ± 0,3	2,8 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 2,1	0,5 ± 2,5	1,0	1,0
3	4,0	3,4 ± 0,7	3,5 ± 0,4	0,3 ± 0,2	0,5 ± 0,1	9,8 ± 7,3	6,1 ± 4,4	1,0	1,5
	8,0	4,1 ± 0,3	4,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,3	14,3 ± 3,3	4,6 ± 7,2	2,0	2,0
	12,0	5,7 ± 0,7	5,8 ± 0,5	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,2	11,1 ± 2,7	2,8 ± 5,8	1,5	2,0
	16,0	3,8 ± 0,8	3,9 ± 0,4	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,3	5,0 ± 2,3	1,9 ± 3,3	1,0	2,0
	20,0	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	1,2 ± 2,1	0,3 ± 2,5	1,0	1,0
4	4,0	2,2 ± 0,3	1,9 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	6,9 ± 2,9	2,8 ± 2,9	1,5	1,5
	8,0	6,0 ± 0,6	5,2 ± 0,3	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,3	17,7 ± 2,3	3,4 ± 9,5	2,5	2,5
	12,0	5,3 ± 0,5	5,1 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,3	15,5 ± 3,2	2,8 ± 7,9	2,0	1,5
	16,0	5,4 ± 0,6	5,6 ± 0,7	1,1 ± 0,2	1,3 ± 0,3	20,0 ± 1,6	4,4 ± 11,0	2,5	3
	20,0	2,9 ± 0,3	1,2 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	5,2 ± 2,1	0,2 ± 2,5	1,0	1,0
5	4,0	3,5 ± 0,4	3,3 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,7 ± 0,2	17,0 ± 3,1	4,3 ± 8,6	2,5	3,0
	8,0	3,6 ± 0,2	3,6 ± 0,3	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	22,5 ± 1,1	4,1 ± 12,5	2,5	3,0
	12,0	3,6 ± 1,0	4,3 ± 0,3	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,1	7,0 ± 3,7	3,0 ± 2,8	1,5	1,0
	18,0	5,4 ± 0,4	5,2 ± 0,6	1,3 ± 0,6	0,9 ± 0,1	22,8 ± 9,0	4,0 ± 11,5	2,5	2,5

	20,0	2,9 ± 0,3	1,7 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	4,2 ± 2,1	0,9 ± 2,5	1,0	1,0
6	4,0	3,6 ± 0,4	3,5 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	20,0 ± 1,5	7,3 ± 11,0	2,0	2,5
	8,0	4,7 ± 0,1	4,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,3	16,3 ± 2,6	4,7 ± 8,8	2,0	2,5
	12,0	5,7 ± 0,4	6,2 ± 0,6	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,2	11,2 ± 2,5	2,8 ± 5,8	1,5	1,5
	16,0	3,8 ± 0,7	3,9 ± 0,5	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	5,1 ± 1,0	1,3 ± 3,0	1,0	1,0
	20,0	2,0 ± 0,7	3,4 ± 0,4	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,3	13,6 ± 2,8	3,0 ± 8,5	2,0	2,5
7	3,5	3,0 ± 0,4	2,6 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 1,0	0,9 ± 0,3	0,0	1,0
	7,5	5,6 ± 0,5	4,9 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	8,5 ± 4,0	1,8 ± 3,4	1,0	1,5
	11,5	6,4 ± 0,5	6,3 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	8,3 ± 3,2	4,1 ± 4,7	1,0	1,5
	15,5	3,1 ± 0,2	3,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	5,0 ± 2,6	3,0 ± 1,8	1,0	1,0
	19,5	1,9 ± 0,3	2,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,2 ± 2,1	0,9 ± 2,5	1,0	1,0
8	4,0	4,5 ± 0,2	4,9 ± 0,6	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1	16,7 ± 3,5	3,7 ± 9,5	1,5	1,5
	8,0	4,9 ± 0,1	5,3 ± 0,5	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	20,1 ± 1,1	5,5 ± 11,0	2,0	2,0
	12,0	5,3 ± 0,5	5,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	1,0 ± 0,3	7,1 ± 3,1	2,8 ± 3,0	1,0	1,5
	16,0	5,8 ± 0,7	5,4 ± 0,8	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,1	7,9 ± 6,1	2,8 ± 4,1	1,5	1,0
	20,0	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,2 ± 2,1	0,9 ± 2,5	1,0	1,0
9	4,0	2,2 ± 0,3	1,8 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	10,9 ± 2,3	3,1 ± 6,1	1,0	1,5
	8,0	5,6 ± 0,9	5,1 ± 0,6	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	18,1 ± 5,0	5,8 ± 9,3	2,0	2,0
	12,0	5,4 ± 0,8	5,5 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,3	14,5 ± 1,8	3,0 ± 8,4	1,5	1,5
	16,0	5,3 ± 0,4	5,4 ± 0,6	0,8 ± 0,2	1,3 ± 0,3	14,8 ± 2,0	4,2 ± 8,1	2,0	2,0
	20,0	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,2 ± 2,1	0,9 ± 2,5	1,0	1,0
10	3,0	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,1 ± 0,0	9,2 ± 1,9	3,4 ± 5,2	1,0	1,0
	7,0	4,6 ± 0,4	4,3 ± 0,3	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	8,0 ± 2,1	3,4 ± 4,2	1,0	1,5
	11,0	4,6 ± 0,3	5,0 ± 0,2	0,3 ± 0,4	0,5 ± 0,5	7,4 ± 7,9	4,3 ± 3,3	1,5	2,0
	15,0	4,0 ± 1,2	3,5 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	3,2 ± 2,0	1,5 ± 1,2	1,0	1,0
	19,0	2,9 ± 0,3	3,4 ± 0,7	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	5,2 ± 2,1	0,9 ± 2,5	1,0	1,0

Tab. 2 - Risultati semplificati dell'analisi della RACL e del flusso in CFM e PFM.

TOT BOV.	gg PE	RACL cm2	cm2 flow		% flow		Visual score	
			CFM±DS	PFM±DS	CFM±DS	PFM±DS	CFM	PFM
10	3-4	3,1±0,9	0,3±0,3	0,3±0,3	10,7±6,6	11,5±7,8	1,3±0,7	1,7±0,7
10	7-8	4,9±0,8	0,8±0,3	0,8±0,3	15,4±5,4	16,3±6,4	1,8±0,5	2,1±0,5
10	11-12	5,3±0,7	0,6±0,3	0,7±0,4	10,8±5,5	13,1±7,3	1,5±0,4	1,6±0,4
10	15-16	4,6±1,1	0,5±0,5	0,7±0,6	10,3±8,7	13,1±9,7	1,6±0,8	1,7±0,8
10	19-20	3,3±0,6	0,1±0,1	0,1±0,1	5,2±2,1	0,9±2,5	1,0±1,0	1,0±1,0

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	9	53.9893	5.9988	36.7087	0
Within Groups	74	12.0928	0.1634		
<b>Total:</b>	83	66.0822			

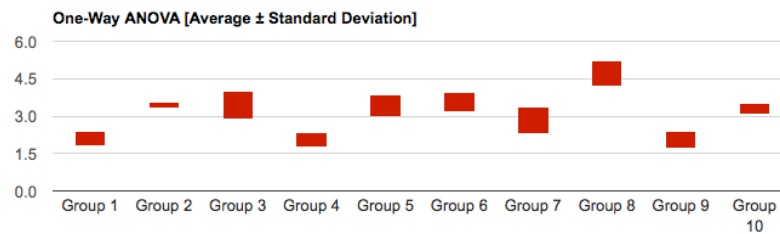


Fig. 7 - Effetto Bovina (P=0,00) per RACL 3-4 gg PE.

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	8	64.3735	8.0467	20.5407	0
Within Groups	68	26.6386	0.3917		
<b>Total:</b>	<b>76</b>	<b>91.0121</b>			

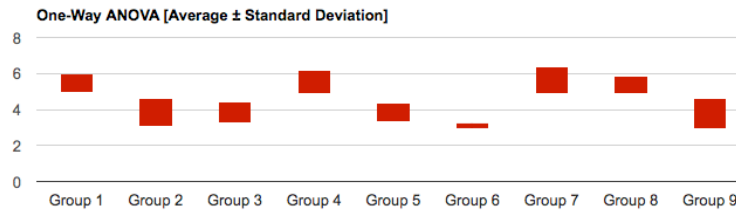


Fig.8 - RACL Effetto Bovina (P=0,00), 18-19 gg PE.

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	9	37.582	4.1758	17.1442	0.75
Within Groups	87	21.1905	0.2436		
<b>Total:</b>	<b>96</b>	<b>58.7725</b>			

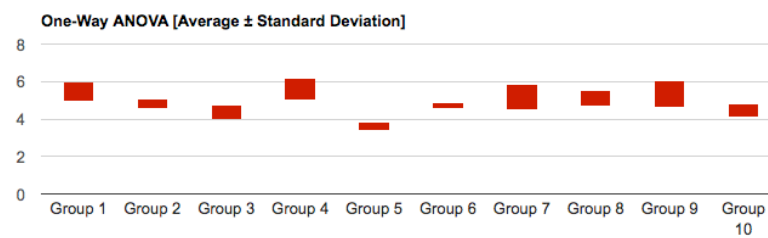


Fig. 9 – RACL 7-8 gg PE assenza di effetto bovina (P=0,75).

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	9	31.3574	3.4842	15.8739	0.75
Within Groups	97	21.2905	0.2195		
<b>Total:</b>	<b>106</b>	<b>52.648</b>			

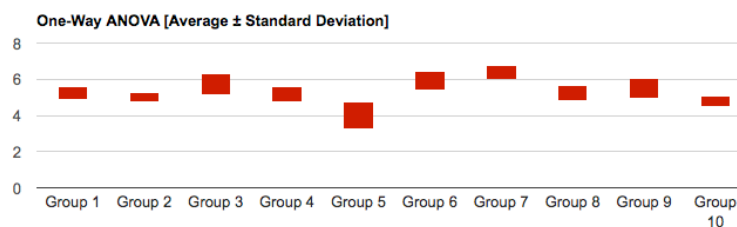


Fig. 10 – RACL 11-12 gg PE assenza di effetto bovina (P=0,75).

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	9	2.5357	0.2817	18.9759	0
Within Groups	38	0.5642	0.0148		
<b>Total:</b>	<b>47</b>	<b>3.0999</b>			

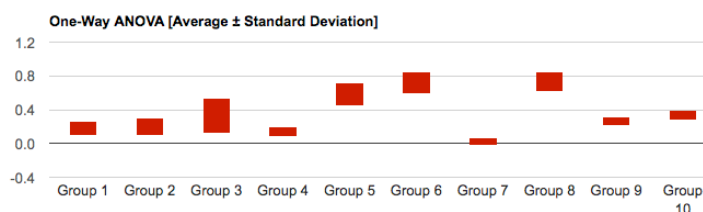


Fig. 11 – RACL in CFM 3-4 gg e 15-6 gg PE, effetto bovina (P=0,00), evidenza di flussi maggiori in CL di grandi dimensioni.

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	9	2.3851	0.265	9.9266	0.75
Within Groups	37	0.9878	0.0267		
<b>Total:</b>	<b>46</b>	<b>3.373</b>			

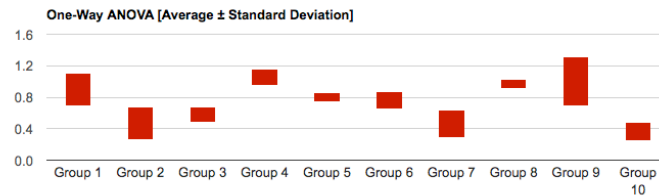


Fig. 12 – RACL in CFM 7-8; 11-12; e 18- 19 gg PE, assenza effetto bovina ( $P=0,75$ ), evidenza di flussi maggiori in CL di grandi dimensioni.

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	9	1.9096	0.2122	12.5301	0.75
Within Groups	27	0.4572	0.0169		
<b>Total:</b>	<b>36</b>	<b>2.3668</b>			

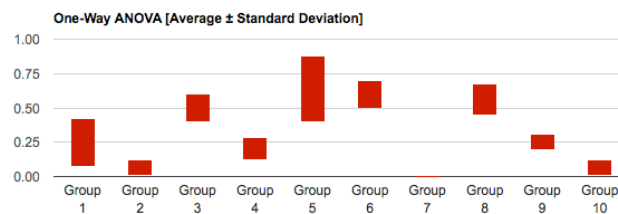


Fig. 13 – RACL in PFM 3-4 gg PE assenza di effetto bovina ( $P=0,75$ ); 7-8 gg PE ( $P=0,76$ ); 11-12 gg PE ( $P=0,80$ ); 18-19 ggPE ( $P=0,75$ ). Evidenza di flussi maggiori in CL di grandi dimensioni (5,6,7,8).

ANOVA Summary					
Source	Degrees of Freedom	Sum of Squares	Mean Square	F-Stat	P-Value
	DF	SS	MS		
Between Groups	8	10.7094	1.3387	21.8011	0
Within Groups	29	1.7807	0.0614		
Total:	37	12.4902			

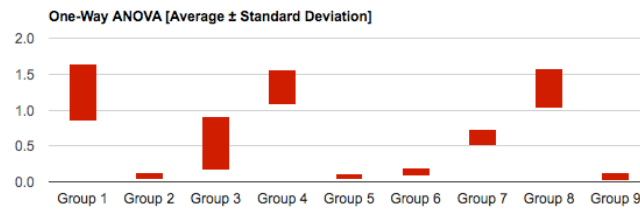


Fig. 14 – RACL in PFM 15-16 gg PE effetto bovina (P=0,00).

## APPENDICE IV: DISCUSSIONE

---

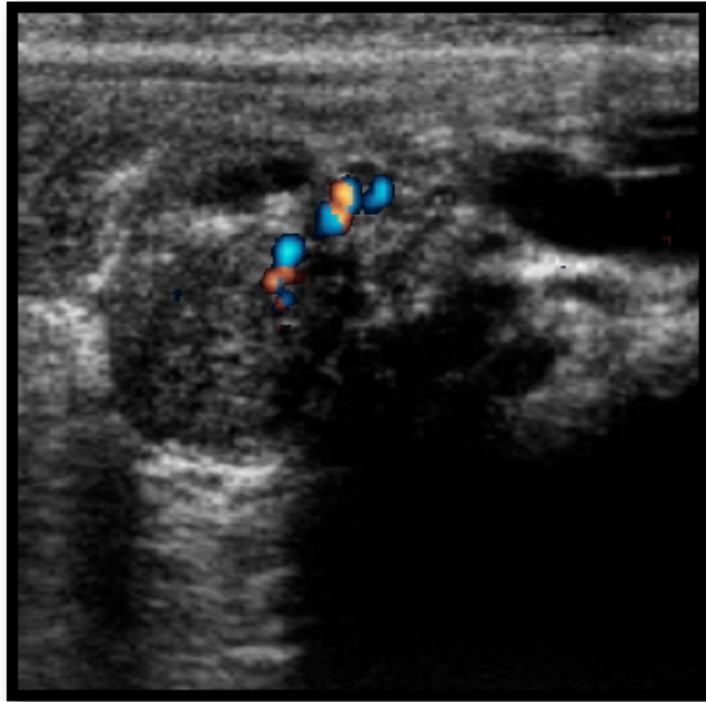
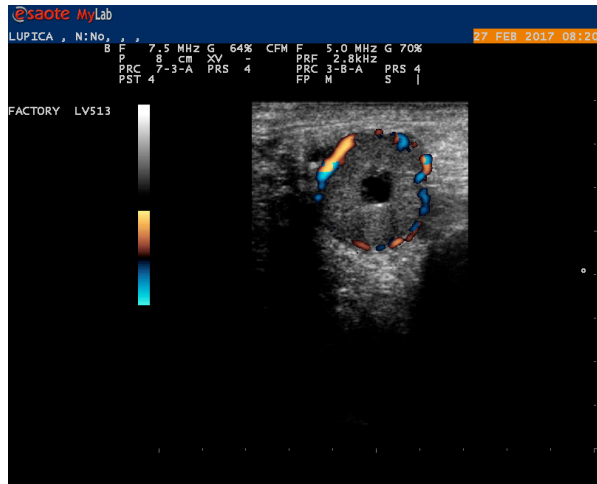
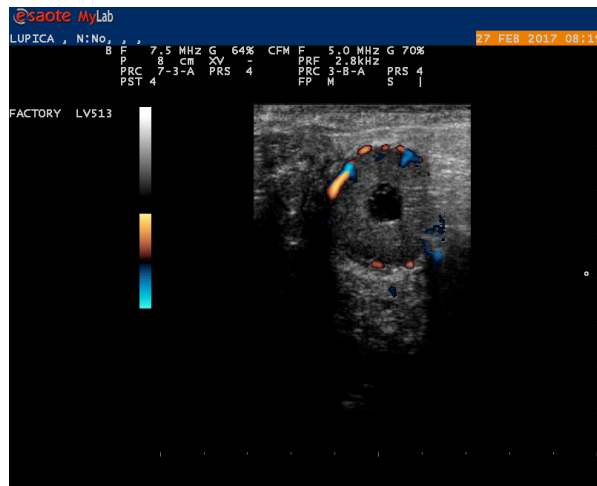


Fig. 15 - Identificazione dell'arteria spirale luteale di un giovane CL (4gg PE) in modalità PFM, assenza di arterie capsulari. (PRF:2.1, Guadagno 64%).





**A**



**B**

Fig.16 - Esempio di alterazione della dinamica del flusso. Assenza di pressione digitale (A), Pressione digitale esercitata sulle arterie capsulari (B).

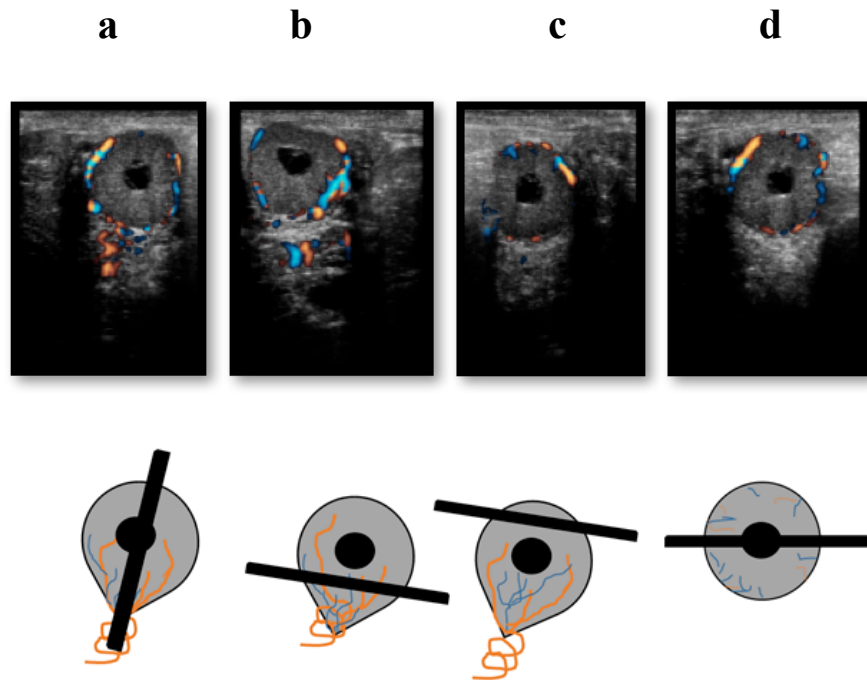


Fig. 17 - Piani di scansione del CL: (a) piano di scansione longitudinale; (b) piano di scansione adiacente al polo caudale del CL. (c) piano di scansione in corrispondenza del polo craniale. (d) piano di scansione trasversale. Fonte: File personali.