

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SALUTE ANIMALE

SEZIONE DI RADIOLOGIA E DIAGNOSTICA PER IMMAGINI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

IN SALUTE ANIMALE

XXI CICLO

**LO STUDIO ECOGRAFICO IN B-MODE E METODICHE DOPPLER,
DELL'OVAIO DEL CANE DURANTE IL CICLO ESTRALE E DOPO
TRATTAMENTO CON CABERGOLINA**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. SANDRO CAVIRANI

Tutore:

Chiar.mo Prof. GIORGIO BERTONI

Dottorando di Ricerca:

Dott.ssa GILIOLA SPATTINI

ANNI ACCADEMICI 2006-2008

A Robby

INDICE

Introduzione ed obiettivi della ricerca	pag. 4
Principi di fisica degli ultrasuoni e delle metodiche doppler.....	pag. 7
L'indagine ecografica dell'attività ovarica della cagna durante il ciclo estrale	pag. 14
L'effetto della somministrazione di un agonista della dopamina (cabergolina) sullo sviluppo follicolare e luteinico durante il pro-estro e l'estro nelle cagne di razza Greyhound....	pag. 34
Lo sviluppo follicolare e la concentrazione plasmatica di LH e di prolattina in cagne in anaestrosi trattate con cabergolina	pag. 45
Lo studio della perfusione ovarica durante il ciclo estrale tramite metodiche doppler.....	pag. 55
Discussione generale e conclusioni	pag. 64
Bibliografia	pag. 74

INTRODUZIONE ED OBIETTIVI DELLA RICERCA



INTRODUCTION AND AIMS OF THE RESEARCH

L'ultrasonografia è una metodica di diagnostica per immagini routinariamente utilizzata in medicina umana e veterinaria. Si basa sull'interazione delle onde sonore con i tessuti biologici. Il maggior vantaggio di questa tecnica consiste nella possibilità di ottenere delle immagini di organi profondi senza alterare l'integrità anatomica del paziente. Questa tecnica fornisce dati che in passato erano acquisiti con metodiche "invasive". Oltre alle immagini bidimensionali e tridimensionali, è possibile studiare i flussi ematici tissutali utilizzando l'effetto Doppler. Questo effetto è noto in natura (i pipistrelli lo utilizzano per cacciare) ed anche alla moderna tecnologia (i radar si basano su tale effetto) e si verifica quando un ultrasuono viene riflesso da un oggetto in movimento. Se l'oggetto è in movimento verso la sonda, l'eco di ritorno avrà una frequenza aumentata, se l'oggetto è in allontanamento dalla sonda, l'eco di ritorno avrà una frequenza diminuita. L'introduzione delle sonde ecografiche duplex (in grado sia di generare immagini bidimensionali che di analizzare l'effetto Doppler), ha aperto una nuova era nell'indagine dell'emodinamica fisiologica e patologica di molti apparati. I risultati delle metodiche doppler non invasive si correlano molto bene con i risultati delle tecniche invasive, permettendo l'acquisizione di dati importantissimi in assenza di effetti collaterali. Una delle maggiori limitazioni dell'effetto Doppler è la dipendenza dello stesso dall'angolo di incidenza del fascio ultrasonoro. Il segnale si riduce fino ad azzerarsi se l'angolo di incidenza degli ultrasuoni si approssima ai 90 gradi. Per evitare questo limite, sono stati introdotti degli indici che permettono di avere delle informazioni del flusso senza dover tenere conto dell'angolo di incidenza del fascio ultrasonoro. Gli indici maggiormente utilizzati sono l'indice di resistività (RI) e quello di pulsatilità (PI). Ad oggi sono ancora limitate le conoscenze dell'emodinamica delle ovaie del cane, nonostante l'importanza economica e scientifica dell'apparato riproduttore di questa specie. Gli scopi del presente lavoro sono:

- 1) Definire una metodica standardizzata per l'indagine ecografica delle ovaie e definire le caratteristiche ecografiche dell'ovaio del cane durante il ciclo estrale;

- 2) Studiare l'effetto della cabergolina, (un agonista della dopamina) sullo sviluppo follicolare e luteinico durante il pro-estro e l'estro nelle cagne di razza greyhound;
- 3) Studiare l'effetto della cabergolina sullo sviluppo follicolare e la concentrazione plasmatica di LH e di prolattina in cagne in anaestrosi;
- 4) Standardizzare una metodica per valutare le variazioni della vascolarizzazione ovarica durante il ciclo estrale della cagna utilizzando il Color e Pulsed Wave doppler.

**PRINCIPI DI FISICA DEGLI ULTRASUONI E DELLE METODICHE DOPPLER
CORRELATI ALLA FORMAZIONE DEGLI ARTEFATTI**



**PHYSIC OF 2D AND DOPPLER ULTRASOUND TECHNOLOGIES CORRELATED
TO IMAGING ARTIFACTS**

Per definizione, è considerato un artefatto “*tutto ciò che non è rappresentativo della struttura indagata ma è avventizio*”.⁽¹⁾ Gli artefatti sono comunemente presenti in ecografia ed è necessario riconoscerli per poter interpretare correttamente le immagini generate. Questi possono fare apparire strutture che non sono reali, non consentire di visualizzarne altre, aumentare o diminuire l’ecogenicità della regione d’interesse, alterarne la forma e le dimensioni dell’immagine finale. La formazione degli artefatti può avere cause ambientali, legate all’operatore, all’interazione tra gli ultrasuoni ed i tessuti o all’elaborazione degli ultrasuoni da parte dell’ecografo (Tab. 1). L’ecografo è un computer a cui è collegata una sonda a cristalli piezoelettrici. I cristalli piezoelettrici sono in grado di generare e di emettere ultrasuoni quando sono stimolati da una corrente elettrica e, viceversa, possono convertire gli ultrasuoni in corrente elettrica. La sonda genera, emette, riceve e rielabora gli ultrasuoni. Il computer elabora gli impulsi elettrici generati dagli ultrasuoni riflessi dai tessuti, basandosi su alcuni postulati:

- 1) la sonda emette un unico fascio di ultrasuoni;
- 2) gli ultrasuoni viaggiano sempre con una traiettoria rettilinea;
- 3) gli echi di ritorno (ultrasuoni riflessi dai tessuti) originano da strutture poste sull’asse longitudinale del fascio ultrasonoro;
- 4) l’intensità dell’ultrasuono di ritorno è direttamente proporzionale alle caratteristiche del tessuto riflettente;
- 5) la velocità degli ultrasuoni nei tessuti è costante, quindi gli ultrasuoni ricevuti dal trasduttore tardivamente sono quelli riflessi da strutture più profonde.

Gli artefatti originano dal fatto che questi postulati non corrispondono alla realtà.⁽¹⁻²⁾ Questo capitolo descrive il meccanismo di formazione degli artefatti e come questi influenzano l’anatomia, la posizione, le dimensioni, la forma e l’ecogenicità delle strutture di cui si crea un’immagine.

AMBIENTALI	OPERATORE DIPENDENTI	INTERAZIONE ULTRASUONI PAZIENTE	ARTEFATTI GENERATI DALL'ECOGRAFO
<i>Artefatti elettromagnetici</i>	<i>Insufficiente preparazione del paziente</i>	<i>Riverberazione</i>	<i>Artefatto del campo superficiale</i>
	<i>Eccessiva inclinazione della sonda rispetto al tessuto</i>	<i>Ombra acustica posteriore</i>	<i>Artefatto della valutazione della velocità di propagazione</i>
	<i>Errato settaggio dell'ecografo</i>	<i>Effetto specchio</i>	<i>Rinforzo di parete posteriore</i>
		<i>Rifrazione</i>	<i>Artefatto da volume parziale</i>
			<i>Artefatti dei lobi laterali</i>

Tab. 1: Classificazione degli artefatti trattati nel testo¹²

ARTEFATTI DI NATURA AMBIENTALE

ARTEFATTI ELETTRICI (Electromagnetic artifacts)

Le attività delle apparecchiature elettromagnetiche in prossimità dell'ecografo, possono causare un'interferenza elettromagnetica responsabile di bande o flash luminosi, pulsati o continui. Una serie di punti luminosi scorre in modo ordinato sull'immagine formando un effetto pioggia, delle reti o delle onde (Fig. 1). Questi artefatti sono presenti indipendentemente dal contatto tra sonda e paziente. Le sonde meccaniche sono più sensibili rispetto alle sonde elettroniche a tali interferenze. La tosatrice elettrica è una frequente fonte di flash luminosi, mentre le onde radio sono spesso responsabili dell'effetto pioggia. Un cantiere edile nelle vicinanze, telefoni, condizionatori, apparecchi radiofonici e televisori possono essere responsabili di questi artefatti. Per trovare la sorgente dell'interferenza si può accendere l'ecografo di notte, spegnere tutte le attrezzature elettriche ed accenderle in modo sequenziale fino a che l'artefatto ricompare. Se l'interferenza persiste allora si può spostare

l'apparecchio ecografico in un altro locale (a volte basta spostarlo di pochi metri per avere una sensibile riduzione dell'artefatto ambientale).

ARTEFATTI OPERATORE DIPENDENTI

INSUFFICIENTE PREPARAZIONE DELLA FINESTRA ACUSTICA

(Poor patient preparation)

L'aria a contatto con la superficie della sonda impedisce la propagazione degli ultrasuoni e non permette di acquisire immagini del paziente (Fig. 2). Molta aria è intrappolata tra le ciocche di pelo. Per questo motivo è necessario asportarlo in modo uniforme. E' consigliabile sgrassare la superficie cutanea con alcool per eliminare impurità e sporcizia che possono ostacolare la trasmissione degli ultrasuoni. E' importante evitare che sostanze alcoliche vengano in diretto contatto con la plastica morbida che ricopre i cristalli piezoelettrici in quanto l'evaporazione dell'alcool potrebbe corrodere o diminuire l'elasticità di questa superficie. Esistono sostanze sgrassanti non corrosive per la plastica o si può applicare l'alcool sulla cute ed aspettare che evapori prima di applicare la sonda. Anche croste od incrostazioni di fango impediscono il corretto passaggio degli ultrasuoni e degradano fortemente l'immagine; in questi casi la zona deve essere detera e pulita oppure si può scegliere una diversa finestra acustica. Sulla cute del paziente rasata e pulita, si applica un copioso strato di gel, il quale, eliminando l'aria ed idratando l'epidermide, permette una migliore trasmissione del fascio ultrasonoro. Nei pazienti molto disidratati ed in alcune razze nordiche quali Siberian Husky, Labrador, Terranova, Samoiedo, etc, la cute è meno adatta al passaggio degli ultrasuoni; è fondamentale sgrassarla a fondo ed applicare il gel 15 minuti prima dell'inizio dell'esame in modo da migliorare la trasmissione degli ultrasuoni e quindi le immagini ottenute.

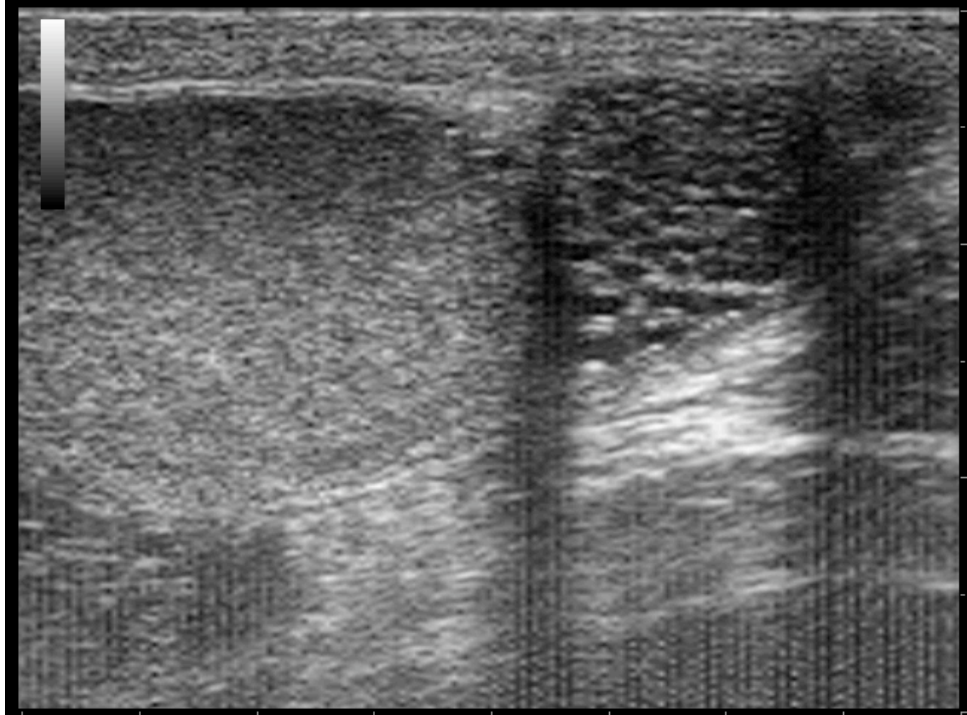


Fig. 1: Artefatti elettromagnetici ambientali: effetto pioggia da elettrobisturi. Nell'immagine sono presenti anche artefatti da rifrazione originanti dalle superfici curve del testicolo e dell'epididimo¹²



Fig. 2: Nella porzione destra dell'immagine la superficie della sonda non è a contatto con la cute del paziente ma con l'aria ambientale: in questa porzione non si ha l'immagine del paziente ma un artefatto da riverberazione con cono d'ombra posteriore¹²

ECCESSIVA INCLINAZIONE DELLA SONDA RISPETTO ALLA STRUTTURA DA STUDIARE (Off normal artifact)

Un'eccessiva angolazione della sonda ecografica rispetto alla struttura da indagare impedisce agli echi di ritorno di raggiungere i cristalli piezoelettrici e quindi previene l'ottenimento di un'immagine ricca di punti luminosi e quindi di dettaglio.⁽²⁾ Questo artefatto è molto marcato nelle sonde lineari dove si possono avere ampie aree ipoecogene a seguito di minime inclinazioni (Fig. 3). E' di frequente riscontro negli esami ecografici dei tendini e dei legamenti, soprattutto nei grossi animali, dove può erroneamente indurre l'ecografista ad emettere una diagnosi di lesione focale (falso positivo). Tale artefatto si genera quando non c'è più una perfetta perpendicolarità tra la superficie della sonda ed il tendine: questo riduce il numero d'echi riflessi captati dalla sonda ed il tendine appare focalmente ipoecogeno rispetto alle porzioni più perpendicolari alla sonda. Se l'area ipoecogena è veramente una lesione, allora deve essere presente in almeno due piani di scansione ortogonali e deve permanere anche a seguito di moderate inclinazioni della sonda. Se invece l'area ipoecogena è presente solo in un piano di scansione o se questa scompare cambiando l'inclinazione della sonda rispetto al tessuto d'interesse allora è un artefatto. Tale artefatto può essere corretto mantenendo il fascio ultrasonoro perpendicolare alla struttura d'interesse. Quando questo non è possibile, ad esempio a causa dell'anatomia della regione, si mettono a confronto più scansioni ortogonali dell'area e si valuta la ripetibilità della lesione. In generale è fondamentale rimanere il più perpendicolari possibili agli organi da studiare e traslare la sonda con movimenti lenti, in modo da permettere al maggior numero d'ultrasuoni di tornare alla sonda. Solo migliorando la ricezione degli echi di ritorno è possibile ottenere immagini ecografiche di buona qualità.

ERRATO SETTAGGIO DELL'ECOGRAFO DA PARTE DELL'OPERATORE

Errato settaggio del power

Il ***power*** (letteralmente “potenza”) controlla l’amperaggio che si applica al cristallo piezoelettrico: un maggiore amperaggio determina una maggiore intensità (livello d’energia che attraversa l’unità d’area) del fascio ultrasonoro generato dalla sonda.⁽³⁾ Maggiore sarà l’intensità del fascio ultrasonoro in uscita dalla sonda, maggiore sarà il numero di echi generati dai tessuti attraversati e maggiore sarà la profondità che il fascio riesce a raggiungere prima di essere completamente attenuato. Se l’operatore imposta un ***power*** troppo alto, le interazioni con i tessuti superficiali sono talmente numerose da saturare l’immagine (tantissimi punti luminosi) con la perdita della normale scala di grigi e l’impossibilità di distinguere tessuti ad ecogenicità diversa (Fig. 4). L’operatore tende ad impostare il power al massimo per ottenere più penetrazione ma questo genera una degradazione importante dell’immagine. Un buon compromesso tra profondità e qualità d’immagine si ottiene con il power impostato attorno al 75%. Si può ovviare alla necessità di alzare il power per ottenere profondità scegliendo una sonda con una frequenza inferiore. Minore è la frequenza, minori sono le interazioni con i tessuti incontrati; questo determina una riduzione della risoluzione spaziale, ma il fascio ultrasonoro è meno attenuato e raggiunge una maggiore profondità.

Errato settaggio dei gains

I ***gains*** (letteralmente “guadagni”) regolano l’amplificazione del segnale generato dagli ultrasuoni ricevuti dalla sonda.⁽⁴⁾ Se l’operatore li imposta troppo bassi, gli echi più deboli non sono rappresentati e l’immagine perde dettaglio. Se sono impostati troppo alti, l’immagine si satura ed il contrasto si riduce. E’ possibile amplificare il segnale di ritorno per settori relativi alle diverse profondità, nel tentativo di avere un’immagine il più uniforme possibile. In generale i guadagni dei settori superficiali sono impostati su valori inferiori rispetto a quelli dei settori più profondi allo scopo di compensare l’attenuazione del fascio ultrasonoro.

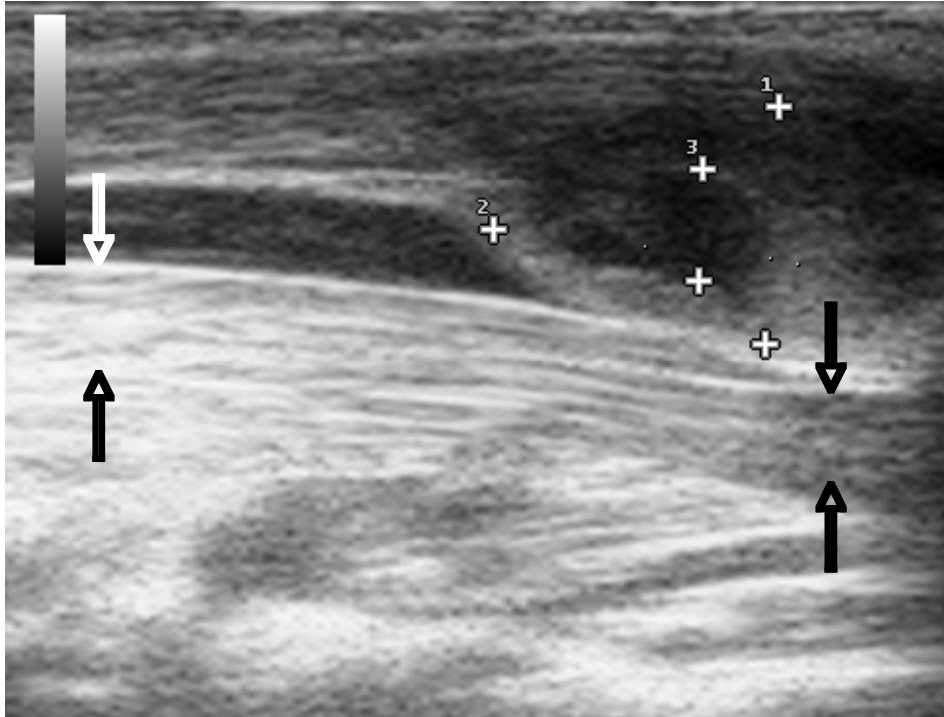


Fig. 3: In quest'immagine l'inclinazione del tendine (tra le frecce) causata dalla lesione occupante spazio più superficiale (croci bianche) crea un artefatto da inclinazione sulla porzione distale del tendine che risulta ipoecogena rispetto alla porzione prossimale, più perpendicolare al fascio ultrasonoro¹²

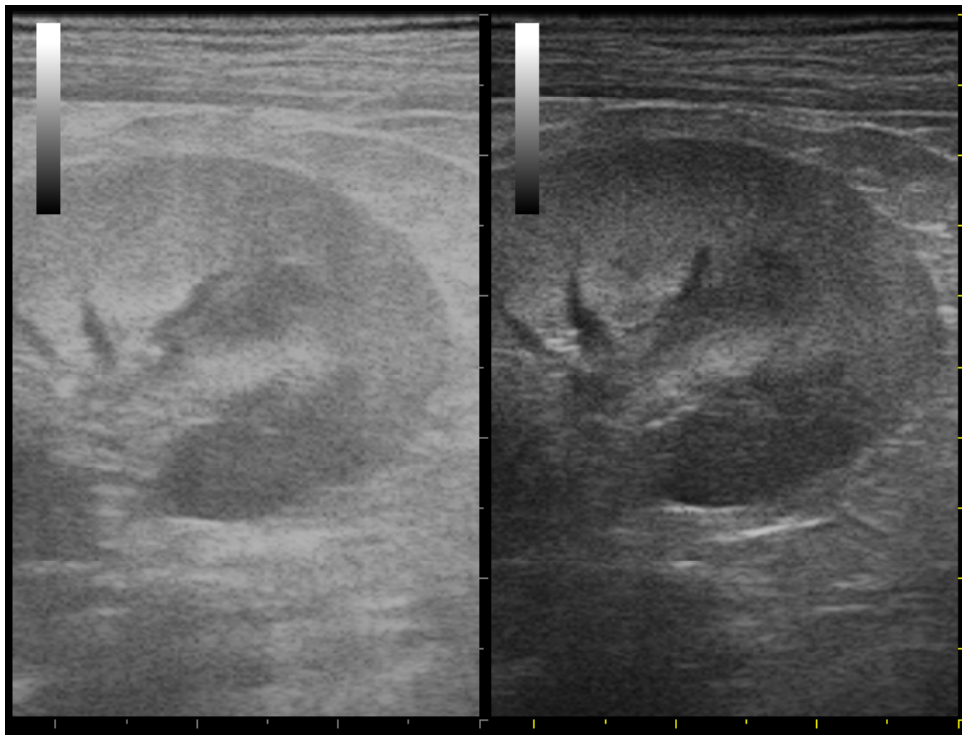


Fig. 4: a) Power e gains impostati troppo alti con saturazione dell'immagine; b) corretta impostazione del power e dei gains¹²

Una regolazione troppo alta dei livelli del power e dei gains da parte dell'operatore è comune quando l'ecografo si trova in ambienti troppo luminosi o quando non si ha un buon passaggio degli ultrasuoni attraverso la cute del paziente. Abbassare le luci ambientali o applicare alcool ed un abbondante strato di gel acustico può migliorare la qualità delle immagini generate e permettere di ridurre i livelli di power e gains.

ARTEFATTI GENERATI DALL'INTERAZIONE TRA PAZIENTE E FASCIO ULTRASONORO

Gli ultrasuoni sono onde sonore ad altissima frequenza, non percepibili dall'orecchio umano. Sono fonti d'energia meccanica che si propagano comprimendo e rarefacendo il mezzo che attraversano. La proprietà di un tessuto di trasmettere gli ultrasuoni si chiama impedenza acustica. Essa dipende dalla densità del tessuto attraversato e dalla velocità dell'ultrasuono in tale tessuto.⁽³⁻⁵⁾ **Impedenza acustica = densità (Kg/m³) X velocità di propagazione (m/s).** Maggiore è l'impedenza acustica di un tessuto, maggiore è la propagazione degli ultrasuoni in quel tessuto, mentre minore è l'impedenza acustica di un tessuto, minore è la capacità degli ultrasuoni di propagarsi in quel tessuto. I tessuti organici definiti tessuti molli o parenchimatosi hanno una densità simile. Il gas e il tessuto osseo hanno densità molto diverse dai tessuti molli. I liquidi hanno una densità leggermente minore rispetto ai tessuti parenchimatosi. La velocità degli ultrasuoni nei tessuti "molli" (es: fegato, milza, reni, etc.) è simile ed ha una media di 1540 m/s. Il fascio ultrasonoro attraversa il tessuto adiposo con una velocità di 1480 m/s, mentre la velocità degli ultrasuoni nell'attraversare il gas è di 331 m/s e nel tessuto osseo è di 4080 m/s. Se le impedenze acustiche di due tessuti adiacenti sono equivalenti, il fascio ultrasonoro viaggia in un mezzo omogeneo, si propaga in modo rettilineo ed è attenuato e riflesso in modo costante e prevedibile, la trasmissione del fascio ultrasonoro segue quindi i postulati iniziali. Se un fascio ultrasonoro incontra un'interfaccia tra tessuti a

diversa impedenza acustica, si generano degli artefatti in quanto il comportamento degli ultrasuoni si discosta dai postulati iniziali. E' evidente che il gas ed il tessuto osseo ed in minor misura il tessuto adiposo ed i liquidi sono fonti d'artefatti.

RIVERBERAZIONE (Reverberation artifact)

Questo artefatto si genera quando il fascio ultrasonoro incontra un'interfaccia con un tessuto a diversa impedenza acustica. E' molto marcato se il secondo tessuto ha un'impedenza acustica inferiore, è quasi assente, anche se teoricamente possibile, se il secondo tessuto ha un'impedenza acustica maggiore.⁽⁶⁾ Nel primo caso (ad esempio il fascio ultrasonoro incontra il contenuto gassoso di un'ansa intestinale dopo aver attraversato la cute, la milza, il peritoneo e la parete dell'intestino) il gas impedisce il passaggio degli ultrasuoni e riflette quasi interamente il fascio alla sonda. Il 99% degli ultrasuoni sono riflessi dall'interfaccia tessuto-gas e tornano alla sonda tutti nello stesso momento. La sonda non è in grado di assorbire e di convertire un numero così elevato e di tale intensità di echi riflessi e si comporta come una seconda interfaccia riflettendo una buona parte degli echi. Queste riflessioni tra la sonda e l'interfaccia a diversa impedenza acustica continuano fino a che l'attenuazione non esaurisce il fascio ultrasonoro. Il computer suppone che gli echi che tornano alla sonda dopo il secondo, terzo, quarto, ecc, rimbalzo, siano echi provenienti da strutture più profonde e genera una serie di linee iperecogene parallele, dall'ecogenicità e spessore progressivamente ridotti per effetto dell'attenuazione (Fig. 5). Il gas è il tessuto che per eccellenza crea artefatti da riverberazione. Un particolare tipo di riverberazione è l'artefatto chiamato ***comet tail*** (coda di cometa).⁽¹⁻³⁾ Esso si verifica quando il fascio ultrasonoro incontra piccole bolle d'aria. Gli ultrasuoni sono riflessi e si instaura la riverberazione, ma la struttura riflettente ha dimensioni così piccole che le successive riverberazioni sono molto vicine creando un effetto a coda di cometa invece che tante linee iperecogene parallele ben distinte tra loro (Fig. 6). La coda di cometa e la riverberazione sono artefatti utilissimi nell'individuare gas libero in addome,

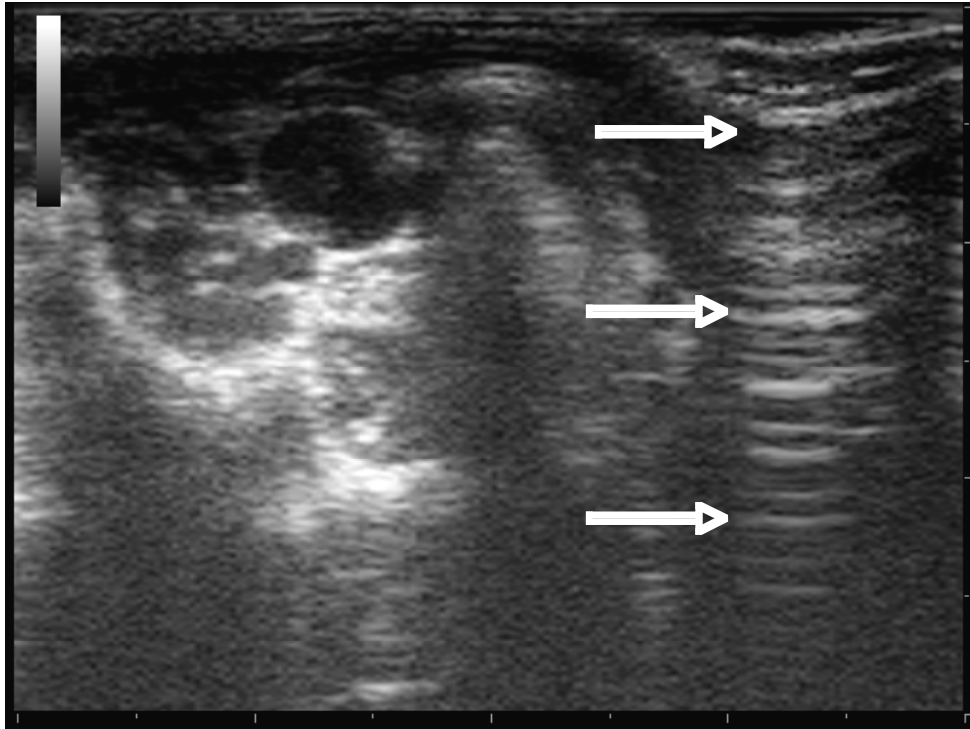


Fig. 5: Artefatto di riverberazione in un paziente con pneumoperitoneo (frece bianche)¹²

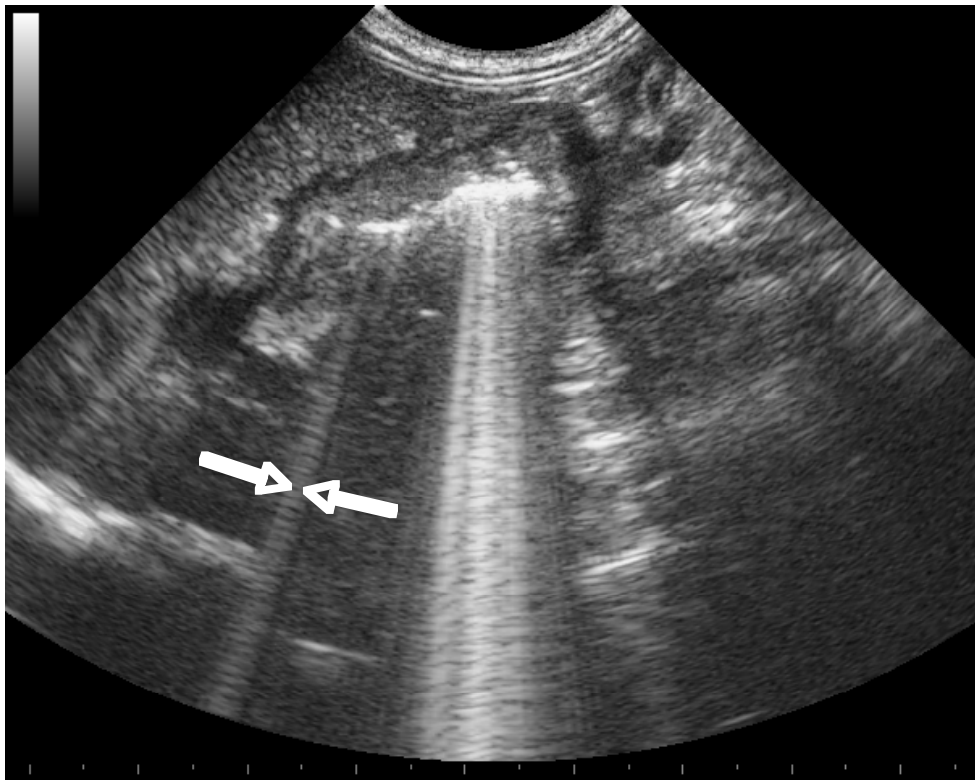


Fig. 6: Coda di cometa (frece bianche) creata dal gas contenuto nello stomaco¹²

lesioni ed organi contenenti gas o nell'identificare l'origine polmonare di una massa toracica. A causa di questo artefatto è consigliabile un digiuno di almeno 12-18 ore per ridurre l'accumulo di gas nell'apparato gastroenterico che impedirebbe di ottenere immagini dai tessuti sottostanti al gas. Alcuni autori consigliano l'uso di antimeteorici prima di un esame ecografico addominale: anche se non sempre necessario può essere un buon espediente per migliorarne la qualità. Quando invece il fascio ultrasonoro incontra un'interfaccia a diversa impedenza acustica ed il secondo tessuto ha un'impedenza acustica maggiore (come ad esempio un fascio ultrasonoro che incontra la superficie del femore dopo aver attraversato la cute e i tessuti muscolari), la maggior parte degli ultrasuoni sono assorbiti dal secondo tessuto e non ritornano alla sonda. L'interfaccia crea in ogni caso una piccola riflessione di massa che potrebbe generare una debole riverberazione. Spesso tuttavia la sonda è in grado di assorbire gli echi riflessi e si ottiene un'*ombra acustica posteriore pulita*. E' il caso del tessuto osseo e dei metalli che hanno un'impedenza acustica molto superiore a quella dei tessuti molli: essi assorbono circa il 70% del fascio ultrasonoro e solo il 30 % del fascio è riflesso e raggiunge la sonda. Viste le premesse ne consegue che il riscontro di un forte artefatto da riverberazione è fortemente suggestivo di un accumulo di gas sul tragitto del fascio ultrasonoro.

OMBRA ACUSTICA POSTERIORE (Acoustic shadowing)

I materiali fortemente riflettenti (gas, aria) o fortemente attenuanti (ossa, corpi estranei) causano la mancanza di echi riflessi dai tessuti sottostanti e questo determina un'ombra acustica posteriore. Nel caso dei tessuti riflettenti, l'ombra acustica posteriore è conseguenza della riflessione quasi totale degli ultrasuoni. Poiché questi non sono in grado di propagarsi nei tessuti sottostanti non viene ottenuta nessuna immagine relativa a tale regione. Spesso in questi materiali l'ombra acustica posteriore si somma all'artefatto di riverberazione dato dalla riflessione degli ultrasuoni e questo crea un'ombra acustica posteriore sporca (Fig. 7). Nel caso dei tessuti fortemente attenuanti, la maggior parte degli ultrasuoni è *assorbita*, quindi

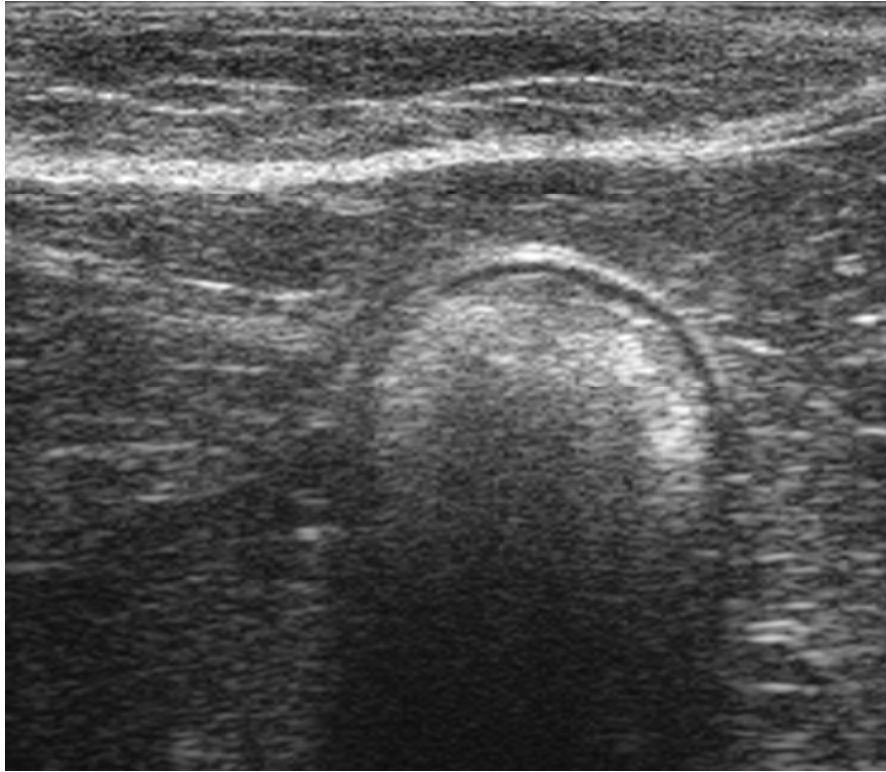


Fig. 7: L'aria nel colon crea un'ombra acustica posteriore sporca¹²

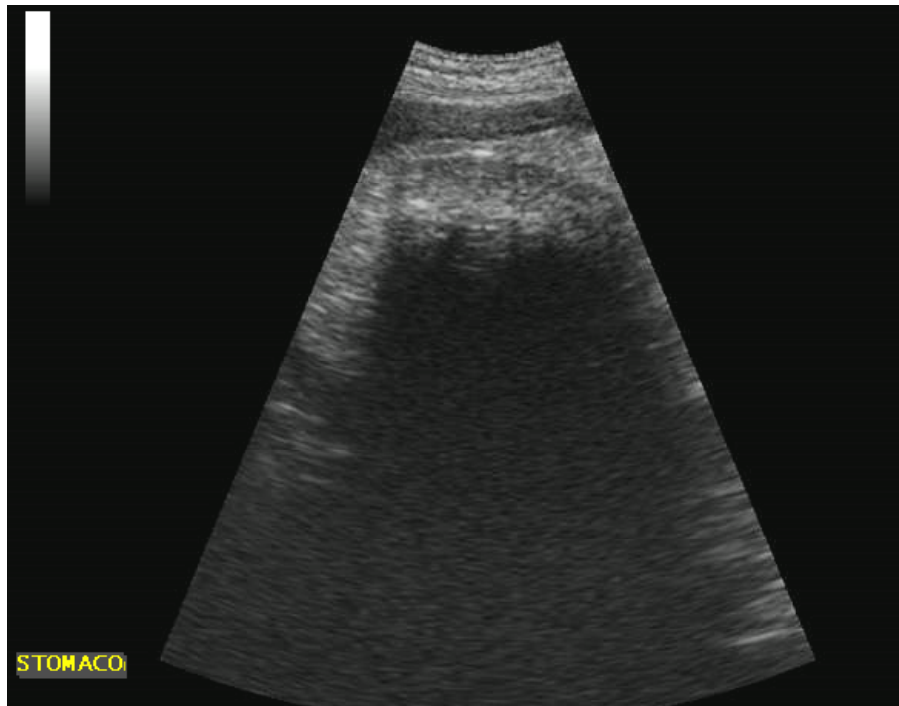


Fig. 8: Un corpo estraneo gastrico crea un'ombra acustica posteriore pulita¹²

non ritorna alla sonda: anche in questo caso non abbiamo informazioni dell'area sottostante per mancanza d'echi riflessi. Questo genera un'ombra acustica posteriore pulita, ovvero completamente anecogena (Fig. 8). E' semplice distinguere le due forme di questo artefatto che spesso aiutano nel differenziare ingesta da corpi estranei gastroenterici.⁽⁷⁾ Questo tipo d'artefatto è molto utile anche per individuare uroliti nel lume vescicale o calcoli nelle vie biliari o nel bacinetto renale.

EFFETTO SPECCHIO (Mirror image artifact)

L'effetto specchio causa la duplicazione dell'immagine di una struttura e posiziona l'immagine artificiale specularmente rispetto alla superficie originante l'artefatto. L'effetto specchio è una forma di riverberazione che avviene alla presenza d'interfacce curve molto riflettenti, aventi un diametro maggiore rispetto alla larghezza del fascio ultrasonoro. L'interfaccia diaframma-pleure genera frequentemente l'effetto specchio.⁽¹⁻⁸⁻⁹⁾ La cistifellea può fornire un buon esempio. Normalmente gli ultrasuoni partono dalla sonda, incontrano la cistifellea, ne sono riflessi e ritornano alla sonda. Altri ultrasuoni non incontrano la cistifellea ma incontrano l'interfaccia diaframmatica, in parte vengono riflessi verso la sonda (dando luogo alla formazione dell'immagine del diaframma), in parte vengono riflessi in direzione diversa. Se questi echi riflessi incontrano la cistifellea sono riflessi di nuovo verso l'interfaccia diaframmatica e da qui verso la sonda (Fig. 9). Il ritardo di questi ultrasuoni rispetto a quelli tornati direttamente alla sonda è considerato indicativo della loro provenienza da una maggiore profondità. L'ecografo si basa sul postulato che gli ultrasuoni viaggiano sempre con una traiettoria rettilinea, quindi la struttura "fantasma" è collocata più in profondità rispetto alla struttura reale, in posizione speculare rispetto alla tangente dell'interfaccia nel punto in cui è avvenuta la riflessione (Fig. 10).

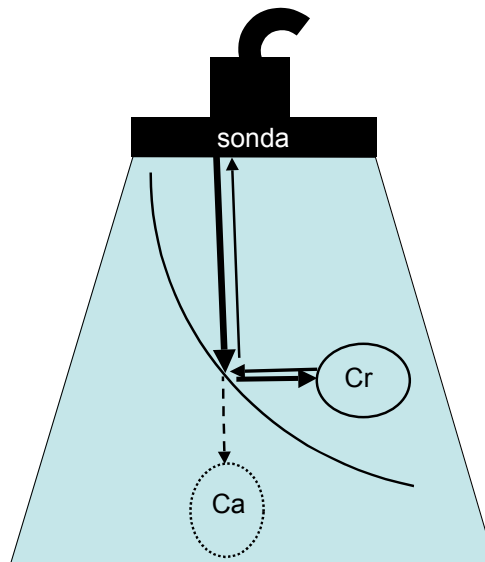


Fig. 9: Effetto specchio: Cr= cistifellea reale; Ca= cistifellea creata dall'effetto specchio. Alcuni ultrasuoni vengono riflessi dall'interfaccia diaframmatica verso la cistifellea la quale funge a sua volta da interfaccia riflettente e rimanda parte di questi echi all'interfaccia diaframmatica (le frecce via via più sottili indicano la riduzione degli echi). Poiché il computer ipotizza che il fascio ultrasonoro abbia una traiettoria rettilinea e poiché gli echi dell'immagine avventizia giungono alla sonda più tardivamente rispetto a quelli provenienti dall'interfaccia che li ha generati, l'immagine fantasma viene collocata più in profondità rispetto al diaframma¹²

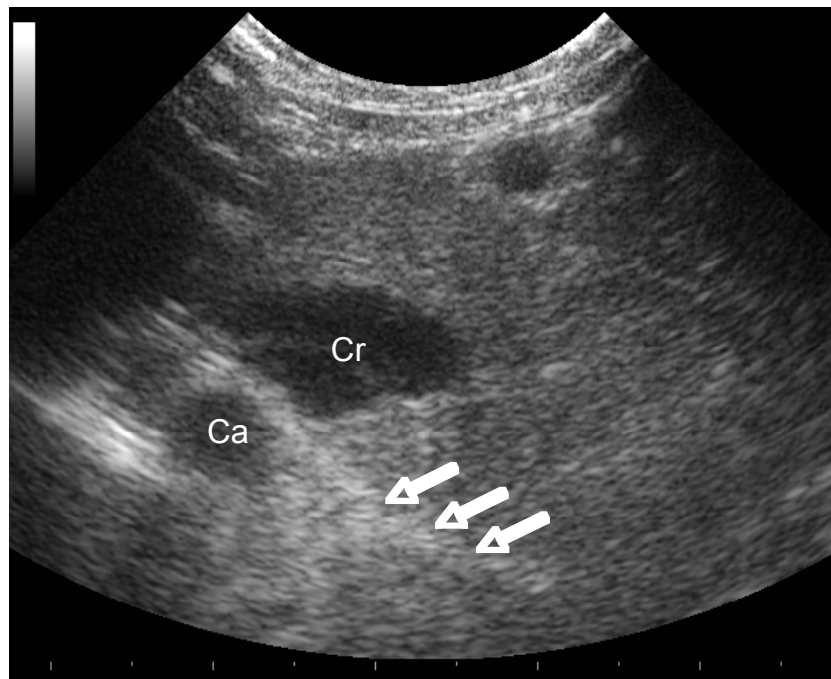


Fig. 10: Effetto specchio all'interfaccia diaframmatica (frecce bianche): l'immagine speculare del fegato e della cistifellea appare in torace. Cr = cistifellea reale; Ca = cistifellea creata dell'effetto specchio¹²

RIFRAZIONE O OMBRE ACUSTICHE LATERALI (Acoustic refraction or Edge-shadowing artifacts)

Quando il fascio d'ultrasuoni colpisce il margine di una struttura curva, gli ultrasuoni vengono rifratti, ovvero cambiano direzione.⁽³⁻⁶⁾ Vengono a mancare gli echi di ritorno da questi margini in quanto non essendo più perpendicolari all'angolo d'incidenza, essi non colpiscono la superficie della sonda. Questo crea un'ombra acustica posteriore nel punto di massima curvatura per mancanza d'echi riflessi. La rifrazione può essere osservata ai margini delle strutture curve (Fig. 11) ed è molto marcata a livello dei reni, della cistifellea, dei vasi portali e della vescica dove, ad esempio, può simulare la rottura dell'organo in pazienti con versamento addominale.

ARTEFATTI GENERATI DALL'ECOGRAFO

ARTEFATTO DEL CAMPO SUPERFICIALE (Near field artifact)

La sonda contiene cristalli piezoelettrici che trasformano impulsi elettrici in ultrasuoni e viceversa. I cristalli sono costituiti da numerosi punti vibranti che interagiscono tra loro e creano un fronte d'onda che satura l'immagine e non permette la rappresentazione reale dei tessuti del paziente nei primi millimetri a contatto con la sonda.⁽²⁾ Questo artefatto è presente in tutte le immagini ecografiche, anche se le sonde meccaniche hanno uno spessore maggiore d'artefatto rispetto a quelle elettroniche. Lo spessore dell'artefatto da campo superficiale si riduce anche all'aumentare della frequenza della sonda. Le sonde lineari hanno il minore spessore d'artefatto. E' fondamentale evitare che la regione di interesse si trovi nell'area dell'artefatto del campo superficiale: esempi comuni sono la porzione superficiale della milza del gatto e la parete ventrale della vescica. Per poter creare immagini diagnostiche da queste strutture molto superficiali si possono usare degli spessori di silicone o anche guanti in lattice

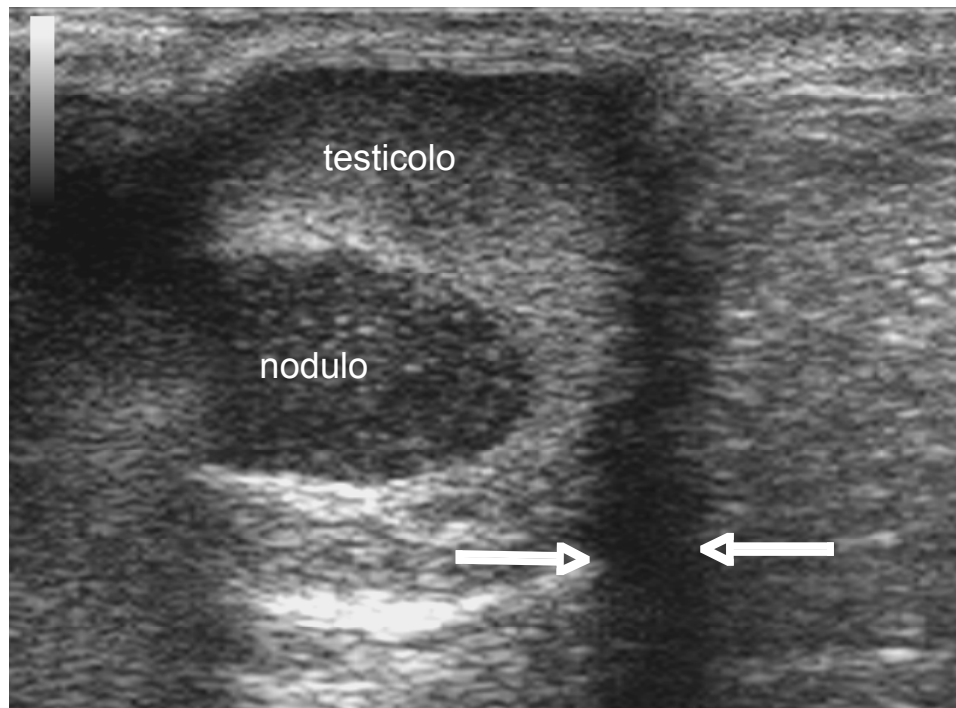


Fig. 11: Rifrazione dal margine curvilineo di un testicolo ritenuto (frece bianche)¹²



Fig. 12: Artefatto da errore della valutazione della velocità di propagazione: la porzione caudale della cistifellea e l'interfaccia diaframmatica alla destra dell'immagine, appaiono interrotte e sono poste più in profondità rispetto alle porzioni craniali. Questo scalino è dovuto al rallentamento del fascio ultrasonoro nell'attraversare lo spesso strato adiposo del legamento falciforme situato prossimalmente alla porzione caudale della cistifellea¹²

pieni d'acqua, avendo avuto cura di non lasciare bolle d'aria all'interno. Si possono anche utilizzare piani di scansione multipli in modo da assicurarsi di aver ottenuto immagini da tutte le porzioni degli organi d'interesse senza dovere ricorrere a dei distanziatori.

ARTEFATTO DA ERRORE DELLA VALUTAZIONE DELLA VELOCITA' DI PROPAGAZIONE (Propagation speed error artifact)

Il computer assume che la velocità degli ultrasuoni nei tessuti sia costante. In questo modo, più tempo intercorre tra l'emissione dell'ultrasuono e il ritorno del suo eco alla sonda, maggiore è la distanza alla quale è avvenuta la riflessione. Se la velocità di propagazione è costante, allora l'ultrasuono che ritorna per primo avrà coperto una distanza minore rispetto ad un ultrasuono che ritorna in un tempo successivo. In realtà la velocità degli ultrasuoni nei tessuti molli è simile ma non costante. Il tessuto adiposo ha la maggiore variazione con 1480 m/s contro i 1540 m/s degli altri tessuti. Questa differenza fa sì che le strutture che si trovano in profondità rispetto ad uno spesso strato di tessuto adiposo, possono essere dislocate nell'immagine più in profondità della loro effettiva posizione, in quanto il ritardo dovuto alla minore velocità di trasmissione degli ultrasuoni nel tessuto adiposo è interpretato come un ritardo dovuto alla maggiore profondità.⁽¹⁰⁾ A volte la cistifellea appare discontinua se si utilizza una finestra acustica con un diverso spessore di legamento falciforme, ricco di tessuto adiposo, da attraversare (Fig. 12).

RINFORZO DI PARETE POSTERIORE (Acoustic enhancement)

Il computer suppone che il fascio ultrasonoro si propaghi nei tessuti con una velocità costante e che subisca un'attenuazione costante e proporzionale alla lunghezza del tragitto attraversato. In conformità a questi postulati il computer deduce che gli echi riflessi che tornano per primi alla sonda hanno viaggiato di meno e sono meno attenuati, mentre gli ultrasuoni che tornano

alla sonda tardivamente hanno viaggiato di più e sono maggiormente attenuati. Per contrastare l'effetto dell'attenuazione ed avere delle immagini uniformi, il computer riduce l'ecogenicità degli echi più superficiali ed amplifica l'ecogenicità degli echi profondi.⁽⁵⁻⁸⁻⁹⁾ Tuttavia gli ultrasuoni che attraversano raccolte di liquidi, sono attenuati di meno rispetto a quelli che viaggiano nei tessuti molli. Per questo motivo i tessuti posti distalmente a raccolte di liquidi appaiono uniformemente iperecogeni rispetto ai tessuti circostanti (Fig. 13). Questo artefatto accade se la densità del tessuto attraversato è inferiore rispetto ai tessuti molli, perciò può non essere presente distalmente ad un ascesso che pur avendo un contenuto "fluido" ha una densità simile agli organi parenchimosi. Questo artefatto è considerato *patognomonico* di una raccolta liquida ed è utile nel differenziare un nodulo anecogeno da una ciste: se il materiale è anecogeno ma parenchimoso, il rinforzo di parete posteriore non sarà presente. Un secondo modo per differenziare un nodulo da una ciste è quello di aumentare al massimo i *gains*: se la struttura è cistica ci sarà una maggiore differenza d'ecogenicità tra la ciste ed i tessuti circostanti; al contrario se la differenza in ecogenicità si riduce significa che la struttura contiene materiale in grado di generare echi e quindi è un parenchima anecogeno.

ARTEFATTO DA VOLUME PARZIALE (Slice thickness artifact)

Questo artefatto è spesso visibile in strutture quali la vescica e la cistifellea dove crea un "pseudo-sedimento".⁽⁴⁻⁸⁻⁹⁾ Il fascio ultrasonoro è tridimensionale e possiede un'altezza, una larghezza ed uno spessore. Lo possiamo immaginare come una fetta di torta. Il computer crea un'immagine bidimensionale partendo da dati tridimensionali e facendo la media dei dati ottenuti dallo spessore. Questo crea l'artefatto da volume parziale in quanto si sommano strutture ecogene con strutture anecogene e nell'immagine sono inserite delle ecogenicità intermedie. Quando si ottengono delle immagini dalla periferia della vescica, il fascio primario può raccogliere informazioni riguardanti sia la parete vescicale che l'urina dando luogo alla formazione dell'immagine di un "pseudo-sedimento". Ci sono diversi modi per

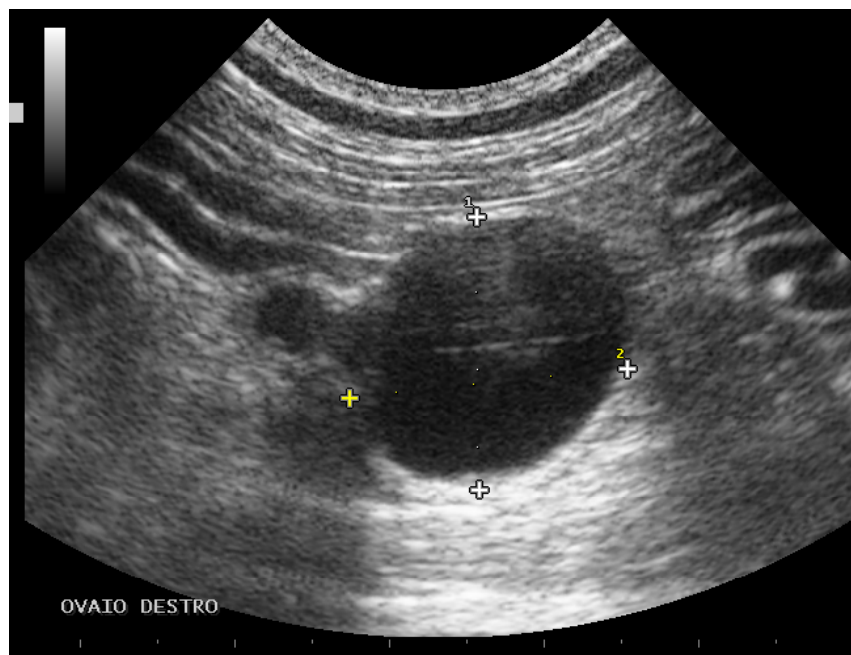


Fig. 13: I tessuti distali a raccolte di liquidi sono più ecogeni rispetto ai tessuti laterali per effetto della minore attenuazione del fascio ultrasonoro. Grazie a questo artefatto è possibile affermare che la struttura in esame è cistica e non parenchimatosa¹²

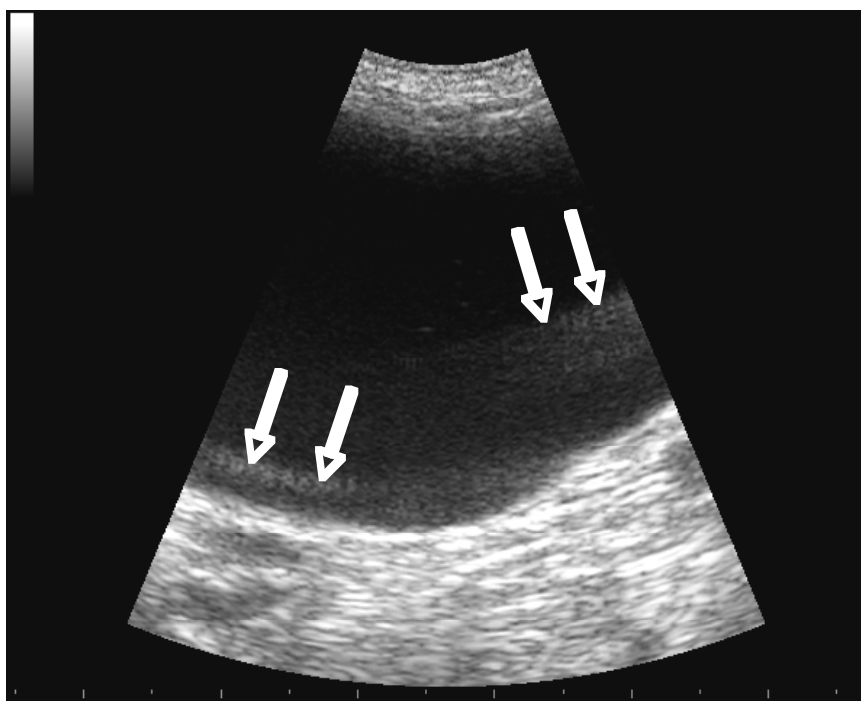


Fig. 14: La banda ricca di foci ecogeni presente sul fondo della vescica (frecche bianche) è causata dall'artefatto da volume parziale (pseudo-sedimento) e non deve essere confusa con il sedimento urinario¹²

differenziare un sedimento vero da uno “pseudo-sedimento”. La superficie del “pseudo-sedimento” è curva mentre la superficie del vero sedimento è piatta (Fig. 14). Solitamente basta inclinare leggermente la sonda e portarsi più al centro della vescica per eliminare l’artefatto. Nei casi dubbi può essere utile cambiare il decubito del paziente per vedere se il sedimento cambia forma e posizione o se rimane invariato. Il “pseudo-sedimento” è più accentuato nella zona focale dove lo spessore del fascio ultrasonoro è compresso elettronicamente e la media è calcolata su più dati. Spostando il fuoco dell’immagine si può ridurre l’artefatto. In realtà in ogni immagine ecografica abbiamo l’artefatto da volume parziale, ma questo risulta visibile solo dove abbiamo strutture anecogene.

ARTEFATTO DEI LOBI LATERALI (Grating lobe/side lobe artifacts)

Il computer suppone che la sonda emetta un unico fascio di ultrasuoni, con direzione perpendicolare rispetto alla superficie della sonda. In realtà esistono altri fasci secondari posti ai lati del primario (Fig. 15).⁽¹¹⁾ Questi fasci sono creati dai cristalli piezoelettrici, hanno direzioni diverse rispetto al fascio primario e hanno un’intensità inferiore. Non creano effetti visibili in un’immagine ecogena, ma se buona parte dell’immagine è anecogena, i deboli echi dei fasci laterali sono visibili. Il computer assume che tutti gli echi sono derivati dal fascio primario perciò gli echi dei fasci laterali secondari sono posizionati nel centro dell’immagine, come se derivassero dal fascio principale. Questo artefatto contribuisce alla formazione del “pseudo-sedimento” vescicale assieme all’artefatto di volume parziale, ma a differenza di questo, non ha la superficie curva. Ancora una volta la vescica, la cistifellea e grosse raccolte di liquidi anecogeni sono le sedi dove più frequentemente si riscontra l’artefatto. Ad esempio a livello della vescica posso avere deboli echi generati dal colon adiacente, visibili all’interno della vescica (Fig. 16). I fasci laterali sono chiamati in inglese side lobe, ma sono chiamati grating lobe se originano da sonde “array”. Per ridurre gli artefatti da fasci laterali in genere è sufficiente diminuire il gain generale allo scopo di sopprimere gli echi a bassa energia; in

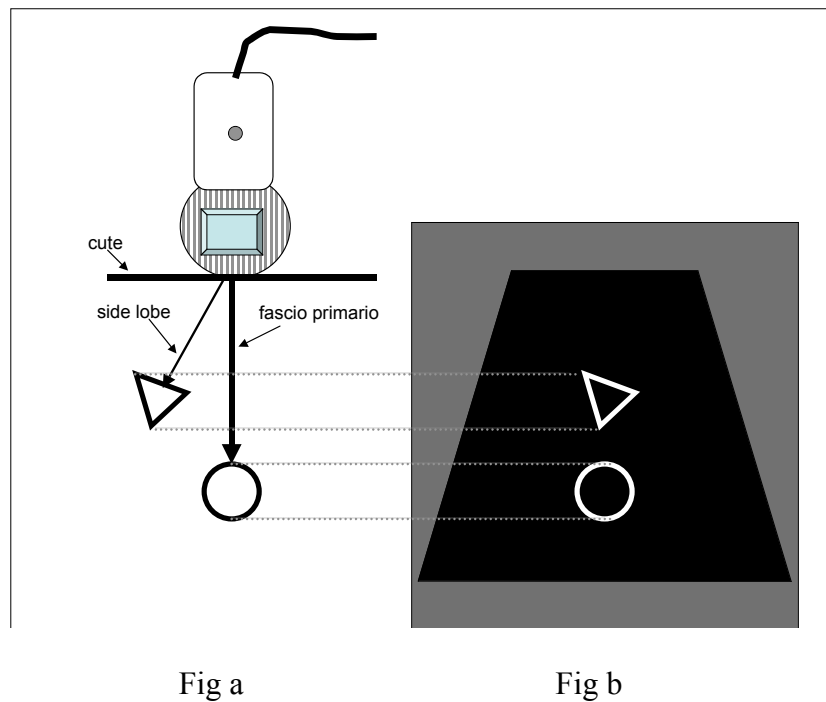


Fig. 15: a) Un fascio laterale invia e riceve degli echi riflessi da una struttura posta lungo il suo tragitto (triangolo). Il computer ignora l'esistenza dei fasci laterali e suppone che tutti gli echi riflessi (cerchio) siano generati dal fascio ultrasonoro principale che si propaga assialmente. Per questo motivo strutture non colpite dal fascio primario, ma di lato a questo (e dunque non dovrebbero comparire nell'immagine), vengono erroneamente rappresentate come se lo fossero e dunque in una posizione errata
b) Nell'immagine finale il triangolo è collocato alla giusta profondità ma sul piano sbagliato¹²

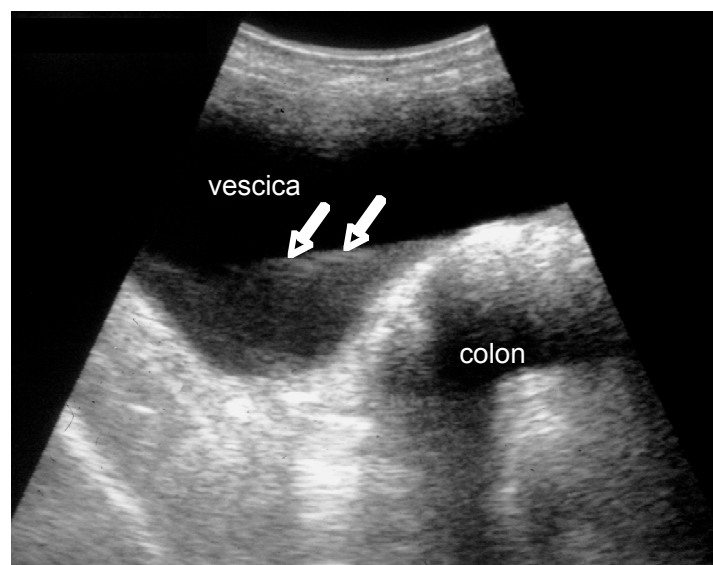


Fig. 16: Per effetto dei "lobi" laterali, gli echi generati dal colon sono rappresentati all'interno della vescica (freccie bianche)¹²

questo modo è possibile eliminarli quasi completamente senza ridurre il dettaglio dell'immagine.¹²

METODICHE DOPPLER

Le metodiche doppler quali, il Color doppler, Continuous Wave Doppler (CW) e Pulsed Wave Doppler (PW), permettono di indagare l'emodinamica vascolare in modo non invasivo. Dal punto di vista tecnico vengono utilizzate sonde duplex in grado sia di generare e ricevere gli ultrasuoni per ottenere l'immagine bidimensionale, sia di generare e ricevere gli echi per l'effetto doppler. L'effetto doppler è noto in natura (i pipistrelli lo utilizzano per cacciare) ed anche nella tecnologia moderna (i radar si basano su questo effetto).^{13,14} Un ultrasuono che incontra un oggetto in movimento è riflesso con una frequenza aumentata (lunghezza d'onda minore) se l'oggetto è in movimento verso l'operatore, mentre viene riflesso con una frequenza diminuita (lunghezza d'onda maggiore) se l'oggetto si sta allontanando dalla sonda. Questa variazione di frequenza, o effetto doppler, è captata dall'ecografo ed il segnale viene trasformato per poter essere convertito in dati riguardanti la direzione e la velocità del flusso.

COLOR DOPPLER

Gli echi che ritornano dai tessuti stazionari sono convertiti dalla sonda in immagini bidimensionali. La profondità alla quale l'eco riflesso viene collocato nell'immagine, dipende dal tempo intercorso tra l'emissione e la ricezione dell'eco, mentre l'ecogenicità dell'eco è determinata dalla sua intensità. Se l'eco di ritorno ha una frequenza diversa rispetto all'ultrasuono d'emissione, significa che è avvenuto un effetto doppler. Se l'ultrasuono è stato riflesso da un oggetto in movimento verso la sonda, il segnale doppler è considerato positivo, se l'oggetto riflettente si stava allontanando rispetto alla sonda il segnale doppler è considerato negativo. Se convertiamo gli echi che hanno subito un cambio di frequenza in

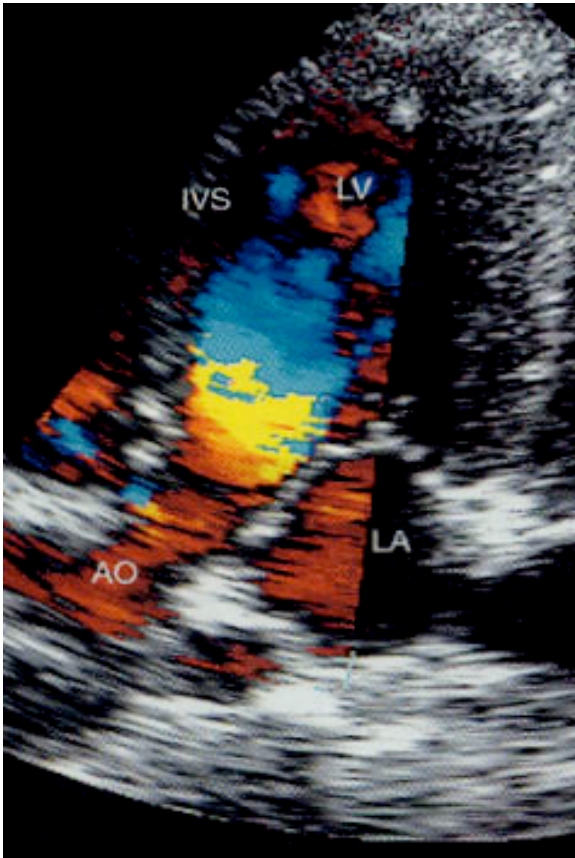


Fig. 17: COLOR DOPPLER: il colore rosso indica che il flusso si sta avvicinando verso la sonda, il colore blu indica che il flusso si sta allontanando dalla sonda, mentre il giallo sta ad indicare un flusso sanguigno ad elevata velocità o un artefatto da aliasing

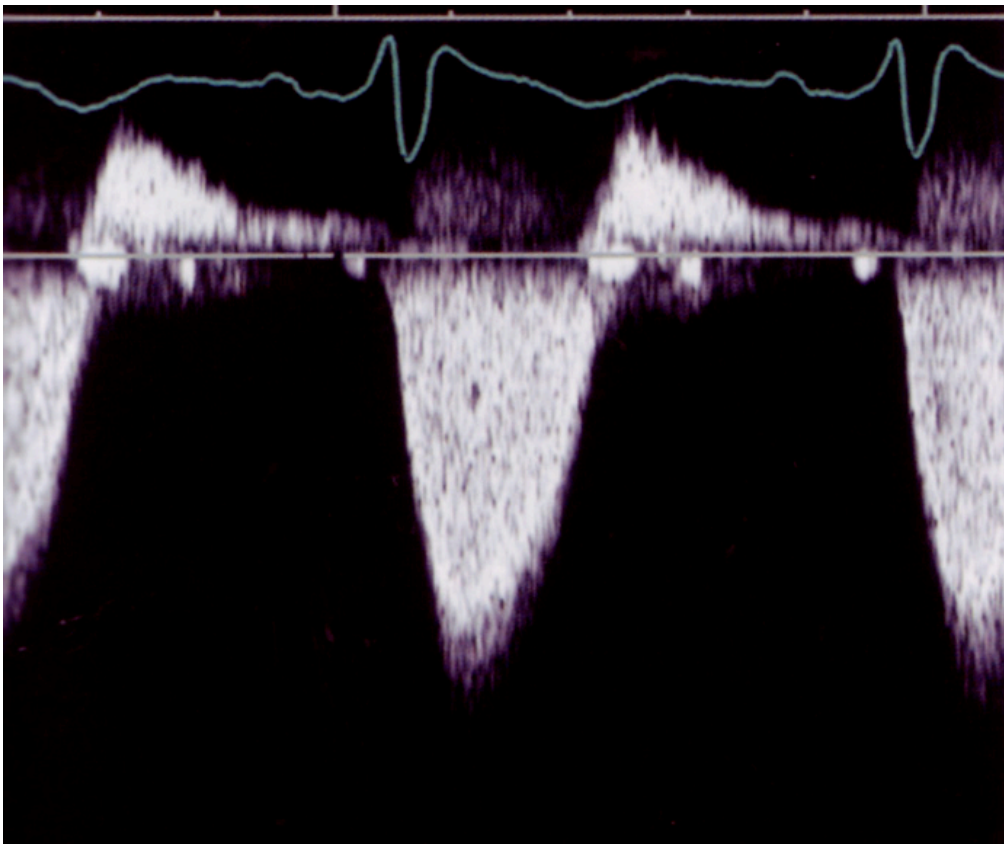


Fig. 18: CONTINUOUS WAVE DOPPLER: il flusso sanguigno viene trasformato in immagine spettrale. Il flusso viene campionato lungo un piano che si estende a tutta la profondità del fascio ultrasonoro

pixel colorati, possiamo dare un colore per gli oggetti in avvicinamento (rosso per convenzione) ed un colore diverso per gli oggetti in allontanamento (blu per convenzione) (Fig. 17). Questa è la base teorica del Color Doppler.¹⁵ Il limite di questa tecnica è la stretta dipendenza dall'angolo d'incidenza del fascio ultrasonoro in quanto, per ottenere un buon segnale, dobbiamo avere il flusso in esame il più possibile parallelo alla direzione del fascio ultrasonoro principale. Questa tecnica non fornisce informazioni sul tipo di flusso presente nel vaso (es. flusso laminare o flusso parabolico).

CONTINUOUS WAVE DOPPLER (CW)

Le sonde che supportano questa tecnologia sono dotate sia di un oscillatore che genera una corrente alternata che viene applicata continuamente al cristallo piezoelettrico per produrre onde ultrasonore, sia di un detector in grado di ricevere ed analizzare le onde sonore di lunghezza d'onda diversa da quella emessa dalla sonda. La differenza tra la frequenza emessa e quella ricevuta (l'effetto doppler) viene analizzata e rappresentata sia sottoforma di un segnale udibile (suono), sia sottoforma di uno spettro (Fig. 18). La linea orizzontale che è presente nelle immagini spettrali, rappresenta la base di partenza, in pratica lo zero o la frequenza che è emessa dalla sonda. Se la frequenza ricevuta dalla sonda è aumentata, allora l'oggetto è in avvicinamento ed il segnale spettrale è positivo e viene posizionato sopra alla linea di base. Se la frequenza ricevuta è diminuita allora il flusso era in allontanamento ed il segnale è negativo e l'immagine spettrale viene visualizzata al di sotto della linea di base. Nel Doppler continuo, il campione è rappresentato da tutti gli echi che il detector capta da una fetta dell'immagine, segnalata da una linea verticale che serve da guida. Avendo un'area di campionatura così ampia, il flusso studiato è la somma dei flussi presenti sulla traiettoria del fascio ultrasonoro principale. Per ovviare a questo inconveniente si può utilizzare il pulsed wave doppler (PW).³

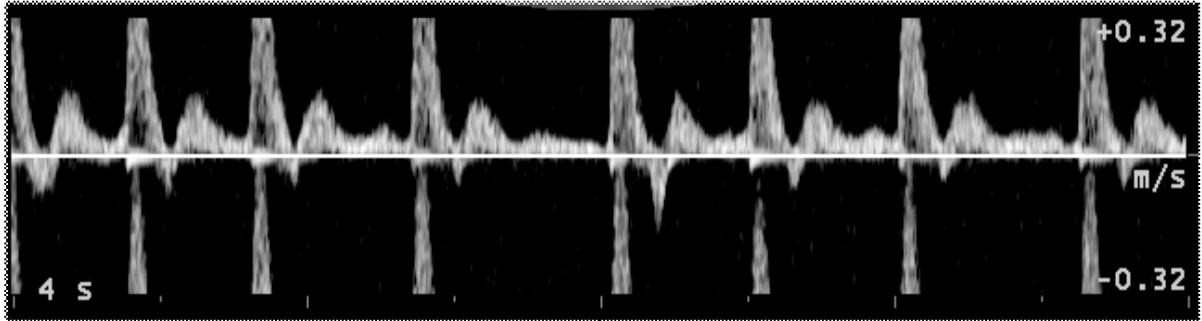


Fig. 19: Il segnale Doppler registrato supera il valore di Nyquist e si genera l'artefatto di aliasing. Nel grafico l'aliasing è rappresentato come picchi sistolici spezzati e riproposti nel quadrante sbagliato (sotto alla linea bianca)

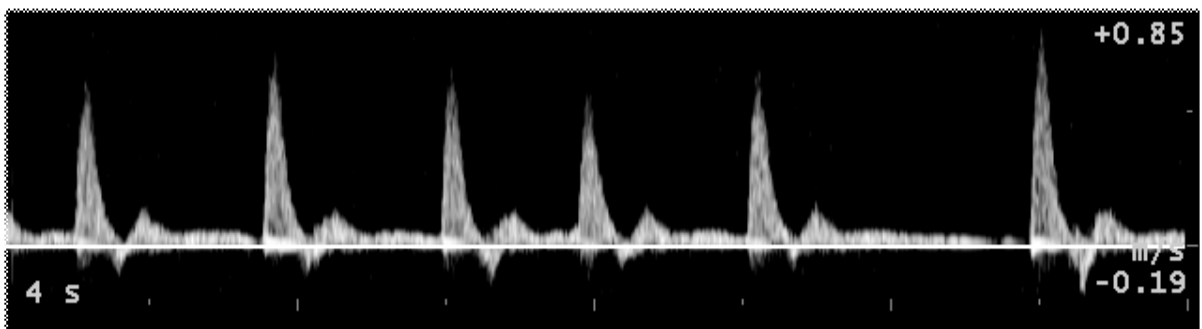


Fig. 20: Stesso flusso di prima, ma l'aliasing è stato corretto abbassando la linea bianca in modo da poter mostrare un doppler shift maggiore nella parte superiore dell'immagine. La correzione dell'aliasing con il PW è possibile fino ad una velocità massima di 2 m/s, troppo bassa per la cardiologia

PULSED WAVE DOPPLER (PW)

Le sonde che supportano questa tecnologia sono dotate di un oscillatore che genera degli impulsi ultrasonori lunghi circa 30 cicli. Gli ultrasuoni emessi per ottenere un'immagine ecografica in 2D, contengono in genere tre cicli. Nel PW, per aumentare l'accuratezza nel determinare il cambio della frequenza dell'eco di ritorno dopo l'effetto doppler, è necessaria una maggiore lunghezza degli ultrasuoni generati. Gli echi che tornano alla sonda sono trasformati in corrente che viene processata in un detector. In questo modo è possibile selezionare una piccola area del fascio ultrasonoro principale dalla quale si desidera avere l'analisi spettrale del flusso vascolare. Il maggiore svantaggio di questa tecnica consiste nell'aver un basso PRF (pulse repetition period), ovvero solo pochi impulsi ultrasonori possono essere emessi dalla sonda in un secondo. Per non incorrere nell'artefatto di aliasing causato da una bassa campionatura dell'area, non possiamo superare il limite di Nyquist (lo shift del segnale doppler non può superare una volta e mezzo il limite del PRF) (Fig. 19) e questo significa che solo basse velocità possono essere processate con questa tecnica, motivo per cui non trova largo impiego nella cardiologia (Fig. 20).^{3,5}

**L'INDAGINE ECOGRAFICA DELL'ATTIVITA' OVARICA NELLA CAGNA
DURANTE IL CICLO ESTRALE**



**THE ULTRASONOGRAPHY OF THE OVARIAN ACTIVITY OF THE BITCH
DURING THE OESTRUS CYCLE**

L'esame ecografico permette di studiare lo sviluppo follicolare e determinare il momento dell'ovulazione nella cavalla, nella bovina e nella scrofa.^{16,17,18} Nella specie canina l'indagine ecografica dello sviluppo follicolare e la determinazione del momento dell'ovulazione sono ancora in fase di studio. Negli anni 80 diversi autori riportano che le ovaie della cagna sono raramente evidenziabili mediante l'ecografia.^{19,20,21} England, utilizza come marker delle sfere metalliche chirurgicamente applicate alle ovaie e conclude che individuare le ovaie nella cagna durante il ciclo estrale è difficile, soprattutto l'ovaio destro.²² Fin dagli anni 90, grazie all'aumentata risoluzione spaziale e temporale delle apparecchiature ecografiche, è stato possibile visualizzare i follicoli durante il loro sviluppo senza particolari difficoltà.^{22,23,24} Risulta però difficile determinare il numero e le dimensioni dei follicoli preovulatori in quanto alcuni follicoli ovulano quando raggiungono le dimensioni di 6 mm mentre altri ovulano intorno ai 10 mm.^{22,25} Secondo alcuni autori l'ovulazione può essere osservata ecograficamente attraverso una rapida diminuzione delle dimensioni dei follicoli.^{25,26} Queste osservazioni non sono state confermate da altri autori, anzi, altri riportano che l'ovulazione nella cagna è di difficile determinazione in quanto la maggior parte dei follicoli non collassa rapidamente, come invece avviene in altre specie domestiche poliovulatorie.^{22,24,27} Complica la situazione la constatazione che nella cagna l'ovulazione è asincrona, con un intervallo tra i primi e gli ultimi follicoli anche superiore alle 24 ore.^{24,28} Ecograficamente i follicoli preovulatori possono essere confusi con corpi lutei in formazione in quanto quest'ultimi, subito dopo l'ovulazione, presentano un centro liquido, quindi anecogeno ed identico al contenuto follicolare.^{24,29} Infine, non è infrequente lo sviluppo di strutture cistiche che complicano il quadro ecografico dell'ovaio.²⁵ Secondo alcuni autori nella cagna più che poter definire il momento dell'ovulazione si può dedurre se questa sia già avvenuta rilevando la diminuzione del numero dei follicoli e la comparsa di strutture luteiniche.^{22,25,28,30}

FASI DELLO SVILUPPO FOLLICOLARE NELLA CAGNA

Nella cagna, la forma iniziale del gamete femminile è il follicolo primordiale che compare dal primo mese dopo la nascita ed è una struttura composta dall'ovocita primario circondato da uno strato di cellule squamose epiteliali definite cellule follicolari. Lo stadio di sviluppo successivo è quello di follicolo primario (o preantrale o unilaminare) in cui lo strato di cellule squamose epiteliali viene sostituito da uno strato di cellule epiteliali cuboidali. Nel follicolo secondario l'ovocita è circondato da uno strato di cellule epiteliali poliedrali definite cellule della granulosa e nel follicolo terziario l'ovocita e lo strato di cellule della granulosa sono circondati da una membrana basale. All'esterno di questa membrana si forma uno strato di cellule stromali dette cellule della teca. Man mano che il follicolo terziario si sviluppa le cellule della granulosa producono del liquido espandendo la cavità che contiene l'ovocita. Questo liquido va aumentando fino a formare una struttura detta antra ed il follicolo a questo stadio viene definito follicolo antrale (o di Graaf). Dal punto di vista ecografico le strutture follicolari non sono distinguibili dallo stroma ovarico fino a quando non si forma l'antra ripieno di liquido ed i follicoli raggiungono dimensioni di 1-2 mm, questo avviene in genere durante i primi giorni del proestro. Lo stadio finale dello sviluppo del follicolo ovarico è l'ovulazione a cui segue la formazione dei corpi lutei. Dopo circa 40-50 giorni dall'ovulazione i corpi lutei regrediscono e si formano i corpi albicanti costituiti da un residuo di tessuto connettivo cicatriziale non riconoscibile ecograficamente.

LA DETERMINAZIONE DEL MOMENTO DELL'INSEMINAZIONE ED IL RUOLO DELL'INDAGINE ECOGRAFICA

Nella cagna, a differenza delle altre specie domestiche, al momento dell'ovulazione sono estrusi ovociti primari che per diventare ovociti secondari e quindi fertilizzabili necessitano di un periodo di maturazione di 2-4 giorni.^{31,32} Una volta maturati, gli ovociti rimangono vitali per altri 2-5 giorni.^{33,34} Considerando che il seme canino nelle vie genitali femminili si mantiene

vitale per 4-7 giorni e che il picco di LH precede l'ovulazione di 36-50 ore, il momento migliore per l'inseminazione si ha 4-5 giorni dopo il picco dell'LH e quindi subito dopo l'ovulazione (Fig. 21).^{31,35,36,37} Nella pratica clinica si segue il ciclo della cagna dal momento in cui il proprietario nota le prime perdite sierose-emorragiche. A questo punto si determina in quale stadio del calore la cagna si trova e con la migliore approssimazione possibile il momento dell'ovulazione. Per fare questo la cagna viene sottoposta a visita ginecologica, striscio vaginale ed ecografia di utero ed ovaie. Nella cagna il primo giorno del proestro può essere definito come il primo giorno in cui si rilevano delle perdite vulvari sierose-ematiche.³⁸ Il proestro è caratterizzato da edema vulvare, presenza di perdite sierose ematiche vaginali, mancata accettazione del maschio, progressiva cheratinizzazione dell'epitelio vaginale e livelli di progesterone inferiori a 5 ng/ml.³⁹ Il primo giorno dell'estro può essere definito come il primo giorno in cui la cagna accetta il maschio ed è caratterizzato dalla diminuzione dell'edema vulvare e delle perdite vaginali, massima cheratinizzazione dell'epitelio vaginale e livelli di progesterone superiori a 5 ng/ml.^{24,38,39} Con l'inizio dell'estro la percentuale di cellule cheratinizzate nello striscio vaginale supera il 60%. Nella cagna il proestro dura in media 9 giorni con variazioni che vanno dai 3 ai 21 giorni. L'estro dura in media 9 giorni con variazioni che possono andare dai 2 ai 27 giorni. La variabilità della durata del proestro e dell'estro rende difficile predire il momento dell'ovulazione.^{32,33,40} Citologicamente si segue la cagna dal terzo giorno del proestro, poi a giorni alterni fino a che la percentuale delle cellule cheratinizzate nello striscio non raggiunge il 60% in quanto a questo punto si passa dalla fase di proestro a quella di estro. L'esame citologico vaginale è molto utile per determinare se la cagna è nella fase di proestro o di estro ma non permette di determinare quando avviene l'ovulazione. Poiché l'ovulazione avviene 36-50 ore dopo il picco preovulatorio di LH, la valutazione dei livelli ematici di questo ormone permetterebbe di determinare con precisione il momento dell'ovulazione.^{32,36} Il picco preovulatorio di LH nella cagna dura 24-36 ore e consiste in un aumento dei livelli di questo ormone di 20-40 volte

rispetto a quelli osservabili durante il proestro: si passa infatti dai 2-5 ng/ml durante il proestro ai 20-50 ng/ml durante il picco preovulatorio.^{34,37} Purtroppo il dosaggio dell'LH canino è complesso, è costoso, difficilmente reperibile e sono necessari prelievi di sangue seriali con un intervallo massimo di 12 ore. La determinazione dei livelli di progesterone è più semplice: i livelli di progesterone sono inferiori ai 2 ng/ml durante il proestro, e si aggirano intorno ai 5-10 ng/ml al momento dell'ovulazione. Nel giro di una settimana dopo l'ovulazione arrivano a superare i 15-30 ng/ml.^{32,41} Per cui la fecondazione dovrebbe avvenire quando i livelli di progesterone si aggirano tra i 10-20 ng/ml. Se questi sono inferiori ai 4 ng/ml, l'ovulazione non è ancora avvenuta, se sono superiori ai 25 ng/ml è ormai avvenuta da oltre 6-7 giorni per cui la fecondazione sarebbe troppo tardiva. I limiti del dosaggio del progesterone sono la difficoltà di determinare con precisione le variazioni ematiche di questo ormone e la variabilità nei livelli ematici di progesterone tra i soggetti e tra le razze.⁴²

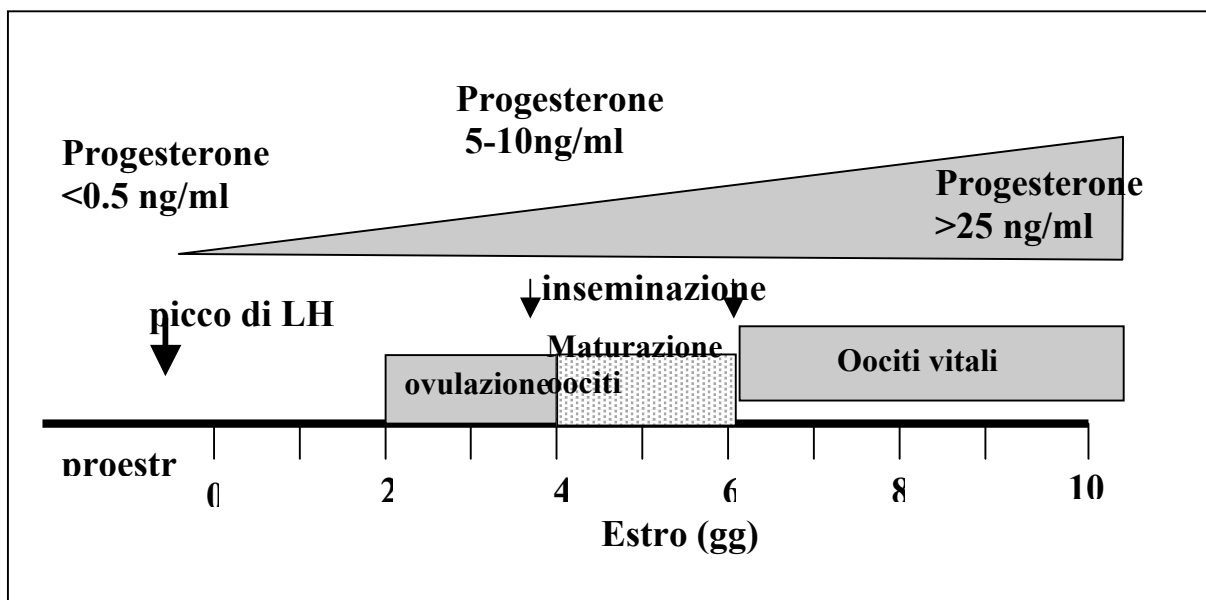


Fig. 21 Picco di LH, livelli ematici di progesterone, ovulazione, maturazione degli oociti, con indicato il momento migliore per l'inseminazione⁴⁴

L'ESAME ULTRASONOGRAFICO DELLE OVAIE DELLA CAGNA

Per l'esame ultrasonografico ottimale delle ovaie si utilizza la sonda lineare o settoriale di almeno 7.5 Mhz. La sonda lineare ha un'ottima risoluzione spaziale e superficiale ma le grosse dimensioni la rendono poco maneggevole negli animali piccoli, per cui in questi casi è preferibile la sonda settoriale. Nelle cagne di grossa taglia oppure obese, a causa della maggiore profondità delle ovaie, può essere necessaria la sonda con frequenza minore per disporre di una migliore penetrazione, anche se la diminuita risoluzione spaziale pone un limite alla diminuzione della frequenza.

Tecnica ecografica per individuare l'ovaio sinistro

Con l'animale in decubito laterale destro con la testa e gli arti rivolti verso l'operatore, si raso accuratamente il pelo sul fianco sinistro appena caudalmente all'ultima costola, distalmente ai muscoli sottolombari, cranialmente all'attaccatura della coscia, dorsalmente alla linea alba. Ecograficamente l'ovaio sinistro è localizzato in un'area delimitata anteriormente dal rene sinistro, ventralmente dai grossi vasi addominali (aorta e vena cava caudale), dorsalmente da tessuto muscolare e caudalmente da anse libere del piccolo intestino. A volte il colon se disteso può sovrapporsi all'ovaio interferendo con la sua visualizzazione. Per diminuire l'interferenza di questa struttura è preferibile il digiuno di almeno 12 ore.

Tecnica ecografica per individuare l'ovaio destro

Con l'animale in decubito laterale sinistro con il dorso rivolto verso l'operatore, si raso il pelo sul fianco destro a livello del penultimo spazio intercostale, distalmente ai muscoli sottolombari, cranialmente all'attaccatura della coscia, dorsalmente alla linea alba. Spesso è necessario l'utilizzo di una finestra acustica intercostale in quanto l'ovaio destro è craniale rispetto all'ovaio sinistro. Ecograficamente l'ovaio destro è localizzato in un'area delimitata anteriormente dal rene destro, ventralmente dai grossi vasi addominali (vena cava caudale ed

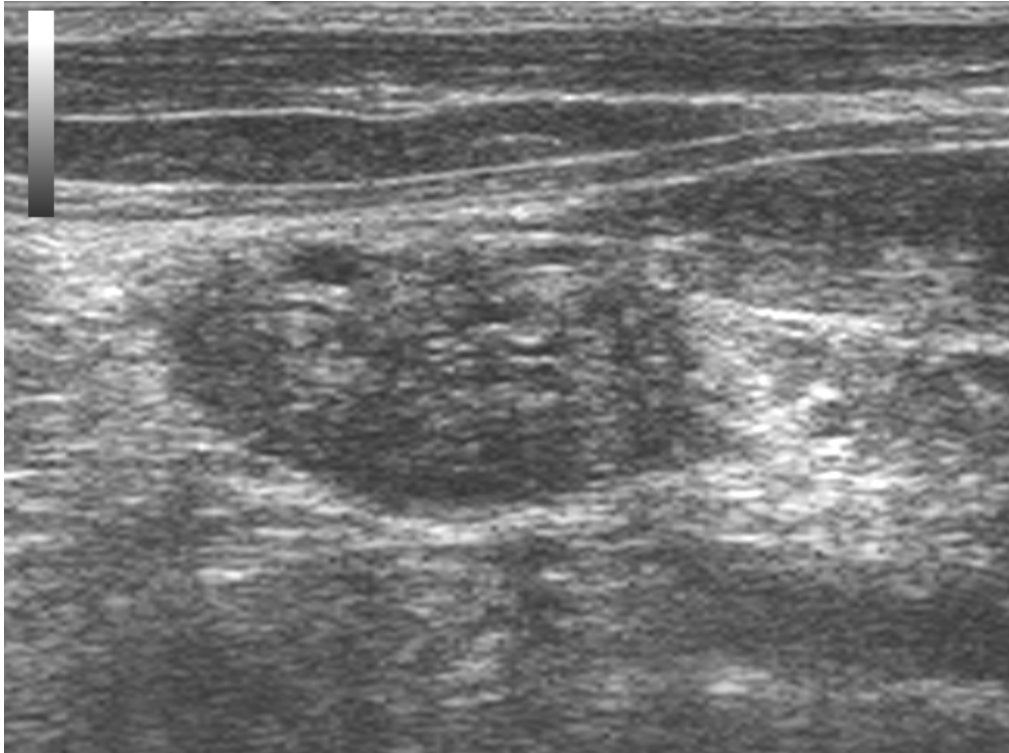


Fig. 22. Ovaio sinistro, secondo giorno del proestro. I follicoli appaiono come piccole ed irregolari aree anecogene nel parenchima ovarico

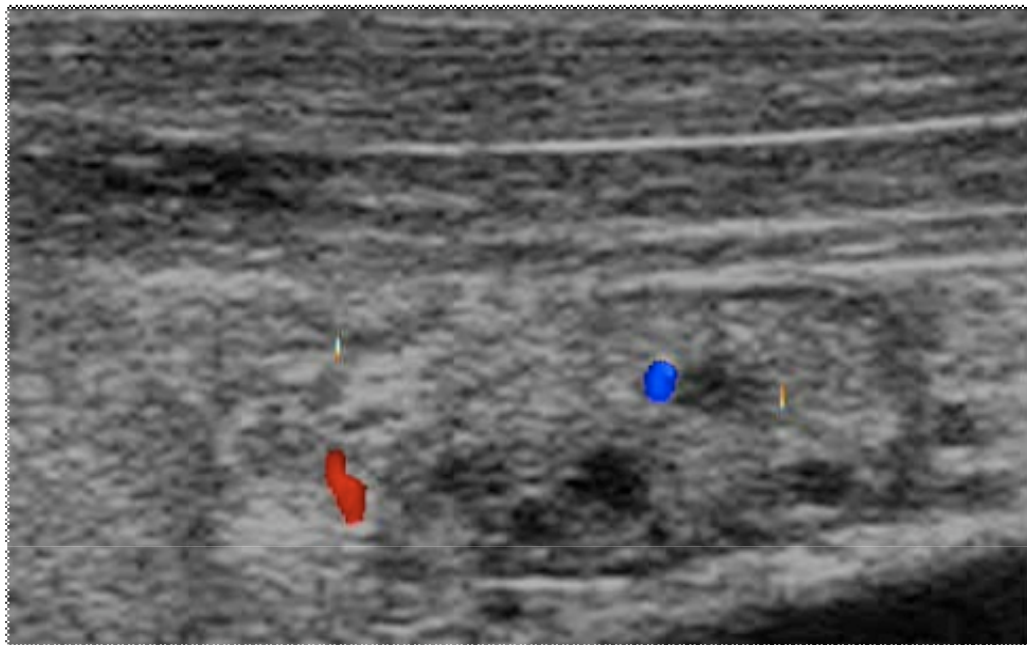


Fig. 23. Ovaio destro, quarto giorno del proestro. I follicoli si evidenziano come aree ipoecogene di alcuni millimetri di diametro privi di parete distinguibile dal parenchima ovarico

aorta), dorsalmente da tessuto muscolare e caudalmente da anse libere del piccolo intestino. Utilizzando il decubito laterale è più facile visualizzare l'ovaio sinistro rispetto al destro (osservazioni personali), mentre con l'animale in stazione quadrupedale, è più semplice identificare l'ovaio destro rispetto a quello sinistro.²⁵

MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELLO SVILUPPO FOLLICOLARE DURANTE IL PROESTRO

Ecograficamente durante il primo ed il secondo giorno del proestro la localizzazione dell'ovaio può essere difficile in quanto se l'antro dei follicoli non contiene abbastanza liquido, questi non sono identificabili come puntiformi aree anecogene e l'ovaio risulta pressoché indifferenziabile dai tessuti circostanti. Dal secondo o terzo giorno del proestro i follicoli cominciano ad intravedersi come strutture anecogene mal definite di circa 1-2 mm (Fig. 22). Queste strutture si accrescono gradualmente fino a raggiungere, nell'arco di 4-5 giorni, le dimensioni di 4-6mm (Tab. 2). Con l'aumento delle dimensioni i follicoli sono facilmente identificabili ed appaiono come aree anecogene rotondeggianti, prive di parete propria (Fig. 23).

MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELLO SVILUPPO FOLLICOLARE DURANTE L'ESTRO E L'OVULAZIONE

Dal punto di vista ecografico nei primi giorni dell'estro i follicoli sono facilmente identificabili e le loro dimensioni si aggirano sui 4-8 mm ma con notevoli differenze soprattutto tra i follicoli delle due ovaie. L'ovulazione generalmente avviene quando i follicoli raggiungono le dimensioni di 9-10 mm ma si può avere l'ovulazione anche a soli 6-8mm (Fig. 24) (Tab. 2). Il momento preciso dell'ovulazione nella cagna non è ecograficamente ben identificabile in quanto, come England riporta, solo il 6% dei follicoli



Fig. 24: ovaio destro, secondo giorno dell'estro. I follicoli deformano l'ovaio. Marcate differenze tra i follicoli, anche di uno stesso ovaio, persistono per tutto il periodo dell'ovulazione⁴⁴



Fig. 25: ovaio destro, secondo giorno dell'estro. In questa cagna i follicoli possiedono una spessa parete che li separa nettamente dal parenchima ovarico. L'ispessimento è dovuto alla luteinizzazione preovulatoria dei follicoli⁴⁴



Fig. 26: ovaio sinistro, sesto giorno dell'estro. Alla destra dell'immagine una struttura ovale anecogena contiene una struttura iperecogena eccentrica adesa alla parete, si ritiene che sia un coagulo nella sede dell'ovulazione. A sinistra è presente un corpo luteo di 4-5 giorni⁴⁴



Fig. 27: ovaio sinistro, nono giorno dell'estro. A destra dell'immagine è presente la stessa struttura di Fig. 26. il fatto che l'area anecogena persista, aumenti di dimensioni e non luteinizzi, fa pensare alla formazione di una cisti ovarica. Un modesto versamento periovarico è presente⁴⁴

Tab. 2 Diametro follicolare (mm) di 6 cagne Greyhound determinato mediante esame ecografico durante il periodo del proestro ed estro. Giorno 0= primo giorno dell'estro. La durata media del calore è stata di 14+2.7 giorni (range 11-16)⁴⁴

Stadio del ciclo (giorni media+SD)	Giorni dall'estro)	diametro (mm)	Range (mm)	n°follicoli/ovaio
proestro	-5	1.1 + 0.2	1.5-1.9	4.3+0.7
proestro	-3	3.1+0.4	2.1-4.2	3.2+0.4
proestro	-1	4.8+0.6	4.2-7.1	3.9+0.8
estro	0	7.2+0.8	5.3-10.1	3.9+0.7
estro	+2	8.3+0.9	7.2-11.1	3.3+0.9

collassano, il 32% dei follicoli non cambiano, il 62% dei follicoli sono rimpiazzati da aree di tessuto moderatamente ipoecogeno senza una parete propria, molto simile ai follicoli preovulatori.²² Alcuni follicoli sembrano non sviluppare in nessuna fase del ciclo una parete nettamente distinguibile dal parenchima ovarico mentre in alcune cagne i follicoli poco prima dell'ovulazione sviluppano una parete spessa anche un millimetro (Fig. 25). Questo sembra essere dovuto alla luteinizzazione preovulatoria dei follicoli ovarici caratteristica di questa specie. Inoltre l'ovulazione dei follicoli nella stessa ovaia è asincrona con un intervallo che può superare le 30 ore.^{24,43} Durante lo studio dei follicoli nella fase dell'ovulazione è possibile osservare, all'interno di alcuni di questi, una struttura iperecogena di 1-2mm adesa alla parete follicolare che potrebbe essere un coagulo formatosi nel punto dove è avvenuta l'espulsione del follicolo (Fig. 26). La presenza di tale struttura indica che il follicolo è ovulato.

MONITORAGGIO ECOGRAFICO DELL'OVAIO DOPO L'OVULAZIONE

Nelle fasi iniziali dello sviluppo del corpo luteo è spesso presente una certa quantità di liquido sieroso-emorragico che nell'arco di alcuni giorni viene completamente riassorbito. La presenza di questo liquido può far confondere ecograficamente i corpi lutei emorragici con dei follicoli antrali; le differenze, non facilmente rilevabili, sono date da un modesto ispessimento della parete che appare quindi più ecogena rispetto alla parete di un follicolo antrale e, alcune volte, dalla presenza di materiale ipoecogeno fluttuante nella cavità che tende ad aumentare di ecogenicità col passare dei giorni. I corpi lutei dopo il quinto o sesto giorno dalla loro formazione, sono distinguibili dal parenchima ovarico in quanto appaiono come strutture rotondeggianti di 4-6 mm parenchimatose ed ecogene con centro irregolarmente ipoecogeno (Fig. 26). A questo stadio nelle ovaie possono apparire con una certa frequenza (20-30% dei casi) delle cisti follicolari che si rilevano come strutture anecogene che continuano a crescere dopo l'ovulazione; è ancora incerto se dal punto di vista endocrinologico siano funzionali. Anche la comparsa di liquido periovarico è un riscontro frequente (Fig. 27). L'ovaio regredisce fino a ritornare la struttura mal definita ed isoecogena rispetto ai tessuti circostanti in circa 20-30 giorni. Lo studio ecografico dell'ovaio durante i periodi di diestro ed anestro può essere difficile⁴⁴.

**L'EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN AGONISTA DELLA
DOPAMINA (CABERGOLINA) SULLO SVILUPPO FOLLICOLARE E LUTEINICO
DURANTE IL PRO-ESTRO E L'ESTRO NELLE CAGNE DI RAZZA GREYHOUND**



**THE EFFECT OF ADMINISTERING A DOPAMINE AGONIST (CABERGOLINA)
ON FOLLICULAR AND LUTEAL DEVELOPMENT DURING PRO-ESTRUS AND
ESTRUS IN THE FEMALE GREYHOUND**

La dopamina e la prolattina hanno un ruolo importante nel controllo dello sviluppo follicolare ovarico durante l'anaestro della cagna. Infatti, la somministrazione di un agonista della dopamina alla cagna in anaestro, riduce la concentrazione plasmatica di prolattina ed induce l'attività ovarica ed un estro fertile, probabilmente tramite l'aumento della secrezione delle gonadotropine e/o l'aumento della risposta ovarica alle gonadotropine.⁴⁵⁻⁴⁶ Questi effetti si correlano con un aumento plasmatico dell'FSH ma non dell'LH.⁴⁷ In letteratura non ci sono dati riguardanti l'azione del sistema dopaminergico e/o della prolattina sull'attività follicolare ovarica e sullo sviluppo dei corpi lutei durante il pro-estro e l'estro nella cagna. In altre specie domestiche, diversi studi hanno messo in luce gli effetti endocrini dell'LH e dell'FSH sulla crescita e sullo sviluppo follicolare.^{48,49} La prolattina interagisce con la funzionalità ovarica ed ha effetti differenti a seconda dello stato fisiologico: diminuisce la sintesi dei recettori dell'LH nei follicoli ovarici del coniglio, accelera la crescita follicolare nei ratti prepuberi, influenza la maturazione dei follicoli subito dopo la luteolisi e elevati livelli plasmatici di prolattina interferiscono con l'ovulazione nella pecora.^{50,51,52,53,54,55} Ricerche effettuate in vitro hanno dimostrato l'azione inibitoria della prolattina sulle cellule della granulosa nel maiale e nell'uomo.^{56,57} L'effetto inibitorio della prolattina presenta anche un'evidenza "in vivo". Nella pecora, elevati livelli plasmatici di prolattina ottenuti tramite iniezioni ripetute di TRH, sopprimono la secrezione dell'estradiolo tramite un'azione diretta della prolattina sull'ovaio.⁵⁸ La dopamina è presente a livello ovarico nel maiale, ma non ne è stata scoperta la funzione. Si ipotizza che la dopamina sia un precursore della noradrenalina.⁵⁹ I dati riportati suggeriscono che il sistema dopaminergico e la prolattina possano avere un ruolo importante nel controllo dell'attività riproduttiva nella femmina del cane e i dati ottenuti da altre specie indicano come la prolattina sia necessaria per mantenere la crescita e lo sviluppo dei follicoli. La cabergolina è un derivato dell'ergolina che ha un'elevata affinità con i recettori D2 per la dopamina ed è un potente agonista della dopamina. Possiede anche una bassa affinità per i recettori serotoninergici 5HT tipo 2 ed una lunga durata d'azione.^{60,61} La cabergolina dovrebbe diminuire

la concentrazione plasmatica della prolattina nelle cagne in anaestro ed in pseudo-gravidanza e dovrebbe indurre attività follicolare nelle femmine in anaestro.^{47,48,62,63} Lo scopo del presente capitolo è quello di indagare l'effetto della somministrazione della cabergolina in cagne greyhound durante il periodo pre-estrale ed estrale per determinarne gli effetti sullo sviluppo dei follicoli e del corpo luteo e confrontarle con cagne della stessa razza non trattate.

MATERIALI E METODI

Per questo studio sono state utilizzate 12 cagne di razza Greyhound di età compresa tra i 5 e i 6 anni. Tutte le cagne avevano una documentata anamnesi riproduttiva di almeno 3 anni antecedenti lo studio. Le cagne venivano controllate dalle 2 alle 4 volte alla settimana per riscontrare i primi segnali del proestro, consistenti in un ingrossamento della vulva o in perdite siero-emorragiche vulvari. L'insorgenza dell'estro era determinata dal primo giorno in cui la femmina accettava l'accoppiamento con il maschio. Ogni giorno la femmina, che presentava segni di proestro, veniva messa in contatto con un maschio e se ne valutava la reazione comportamentale. L'accoppiamento non era permesso. La fine dell'estro veniva indicata come il primo giorno nel quale la femmina non accettava più il maschio.

Trattamento

Sei delle dodici cagne sono state trattate con cabergolina, alla dose di 5 µg/Kg SID (singola somministrazione giornaliera) per os, al mattino, per venti giorni consecutivi; il giorno zero era definito come il primo giorno del proestro. Le restanti sei cagne sono state utilizzate come controllo.

Esame ecografico

Le ovaie e l'apparato riproduttore è stato controllato ecograficamente una volta al giorno durante il proestro e due volte al giorno durante l'estro e il follicolo di maggiori dimensioni di

ogni ovaio veniva costantemente misurato. L'esame ecografico è stato effettuato con un apparecchio ecografico Aloka 500 SD e una sonda lineare da 7.5 MHz. Su entrambi i fianchi, veniva rasata un'area di circa 3 per 4 cm, appena caudalmente all'ultima costola. L'immagine longitudinale del rene era utilizzata come repere anatomico iniziale. Da questa immagine si traslava la sonda fino ad avere sulla destra dello schermo il polo caudale del rispettivo rene; da qui si inclinava la sonda caudalmente e lateralmente fino a che si localizzava l'ovaio. I vasi addominali maggiori (aorta e vena cava caudale) costituivano il margine mediale dell'area all'interno della quale era possibile reperire il rene, mentre i muscoli sottolombari erano il margine dorsale e laterale della stessa area. I follicoli erano classificati in base al loro diametro. Nella classe F1 il follicolo di maggiori dimensioni dell'ovaio misurava meno di 3 mm; in classe F2 il follicolo più grande misurava dai 3 ai 6 mm; in classe F3 il follicolo di diametro maggiore aveva un diametro superiore ai 6 mm di diametro. L'ovulazione era definita come il momento in cui i follicoli F3 cominciavano a ridursi di dimensione o scomparivano dall'ovaio e quando i follicoli post-ovulatori cominciavano ed essere individuati.^{44,64} I follicoli post-ovulatori erano definiti come strutture simili ai follicoli F3 ma con un'ecogenicità maggiore a causa di foci iperecogeni fluttuanti nella cavità antrale e con parete di spessore maggiore rispetto ai follicoli pre-ovulatori. I corpi lutei maturi erano identificati come strutture rotondeggianti con spessa parete da isoecogena a iperecogena rispetto al parenchima ovarico e zona centrale tendenzialmente ipoecogena. I dati ecografici sono stati correlati al profilo plasmatico del progesterone, dell'LH e della prolattina ed è stato possibile stabilire il momento dell'ovulazione in tutte le cagne trattate e non trattate. In tre cagne, due trattate ed una di controllo, è stata rinvenuta, in un ovaio, una struttura anecogena di diametro maggiore di 20 mm. Tali strutture, completamente anecogene e generanti un forte rinforzo di parete posteriore, sono state riscontrate dall'inizio del proestro alla fine dell'estro e sono state considerate cisti ovariche. E' stato prelevato un campione ematico una volta al

giorno durante il proestro e due volte al giorno durante l'estro. I livelli plasmatici di LH, prolattina e progesterone sono stati testati utilizzando metodiche radioimmunologiche.

Analisi statistica

I dati riguardanti le classi follicolari sono stati analizzati con la metodica del chi-quadrato.

RISULTATI

Tutti gli animali hanno avuto un pro-estro ed un estro non differenti per lunghezza e caratteristiche rispetto ai precedenti sei cicli estrali documentati dall'anamnesi. Durante i primissimi giorni del pro-estro l'ovaio aveva piccole dimensioni ed il parenchima ipoecogeno rispetto ai tessuti circostanti. Più dell'ottanta per cento dei follicoli era in classe F1. Le dimensioni follicolari ed ovariche sono via via aumentate per tutta la durata del proestro fino all'inizio dell'estro dove solo follicoli di classe F2 o F3 erano presenti (Fig. 28). In concomitanza con il picco preovulatorio di LH, alcuni follicoli dimostravano un ispessimento parietale, compatibile con una luteinizzazione preovulatoria. Cinque giorni dopo l'inizio dell'estro i primi corpi lutei sono stati individuati chiaramente (Fig. 29). Nove giorni dopo l'inizio dell'estro i corpi lutei erano presenti in tutte le ovaie e le strutture follicolari non erano più visibili. In un ovaio di due cagne trattate ed in un ovaio di una cagna di controllo, è stata osservata una struttura cistica dall'inizio del proestro alla fine dello studio. Tuttavia i profili ormonali ed i restanti follicoli di queste tre cagne non hanno riportato variazioni rispetto alle altre cagne e le strutture cistiche non sono state considerate ormonalmente funzionanti. Dal punto di vista ormonale il picco di LH preovulatorio è stato documentato in 5 cagne trattate e nelle 6 cagne di controllo, in tutte si è verificato entro tre giorni dall'inizio dell'estro. Non sono state riscontrate differenze nella concentrazione di LH tra i due gruppi. I livelli plasmatici di prolattina erano variabili e ridotti nelle cagne trattate, ma non in modo statisticamente significativo. I livelli plasmatici del progesterone erano inferiori a 1 ng/ml

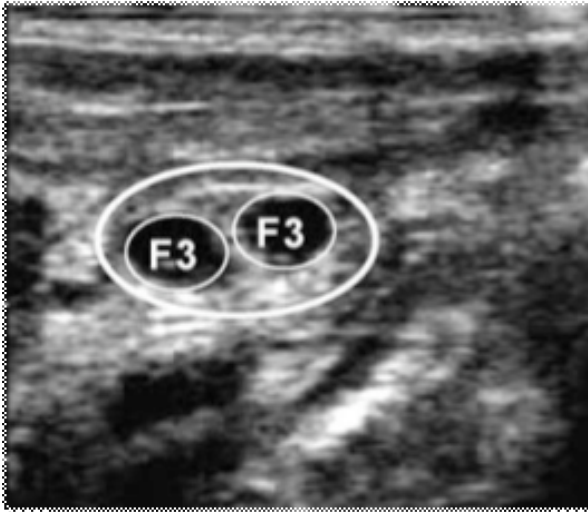


Fig. 28: immagine ecografica di un ovaio che presenta due follicoli in classe tre⁹⁴

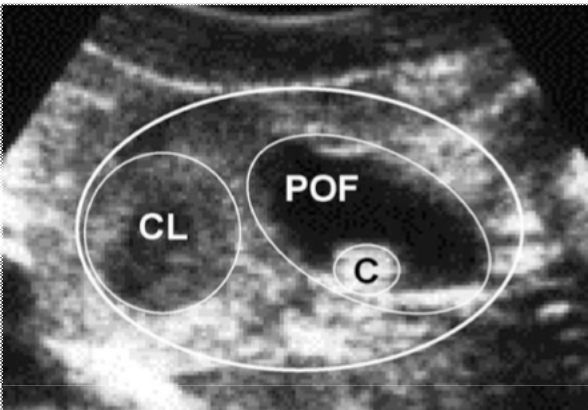


Fig.29: immagine ecografica di un ovaio contenete un follicolo post-ovulatorio ed un corpo luteo. La struttura marcata con una c rappresenta un coagulo ovulatorio⁹⁴

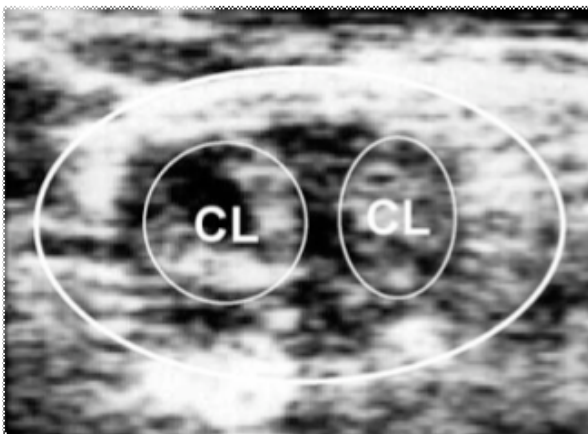


Fig. 30: immagine ecografica di un ovaio con due corpi lutei⁹⁴

prima del picco di LH e gradualmente sono aumentati fino ad una media di 4.66 ng/ml tre giorni dopo il picco preovulatorio di LH, ed una media di 12.0 ng/ml 6 giorni dopo il picco di LH. Non si sono riscontrate differenze tra il livello plasmatico di progesterone delle cagne trattate rispetto alle cagne nel gruppo di controllo. Non sono stati notati, in nessun animale, effetti collaterali durante il trattamento.

DISCUSSIONE

L'ecografia ha permesso di studiare dettagliatamente le strutture follicolari anche se di ridotte dimensioni (3 mm) ed è risultata una metodica affidabile per monitorare i cambiamenti ovarici che intercorrono durante il proestro e l'estro. Lo studio dei livelli ormonali ha confermato che l'ovulazione avveniva intorno al terzo giorno dall'inizio del proestro, dato che trova riscontro in letteratura.^{30,34,64} Durante gli esami ecografici

è stato possibile studiare lo sviluppo dei corpi lutei. E' riportato in letteratura che nel cane è difficile differenziare un follicolo preovulatorio da un corpo luteo in formazione, tuttavia grazie alla maggiore risoluzione laterale degli attuali apparecchi ecografici ed alla scelta della razza greyhound che morfologicamente fornisce le condizioni ideali per ottenere immagini ovariche, è stato possibile studiare le varie fasi ovariche in modo dettagliato e diagnostico.^{22,24}

Il corpo luteo in formazione veniva riconosciuto in quanto presentava parete più spessa ed irregolare rispetto ai follicoli ovulatori (Fig. 30). L'esame ecografico ripetuto ogni 12 ore ha permesso una visione dettagliata dei cambiamenti, anche subdoli, che avvengono dal follicolo ovulatorio al corpo luteo in formazione. In due animali trattati ed in un animale di controllo, sono state rinvenute strutture che avevano le caratteristiche di follicoli atipici e persistenti. Queste strutture potrebbero essere cisti follicolari o follicoli che non sono giunti all'ovulazione. La presenza di cisti ovariche subito dopo l'ovulazione è già stata riportata in letteratura ma non se ne conosce il significato funzionale.^{28,65} Nelle nostre osservazioni queste strutture sono relativamente comuni nelle cagne ma non interferiscono con la fertilità

dell'animale. In ogni modo saranno necessari altri studi per studiare la loro natura e la loro funzione. I livelli plasmatici di progesterone, LH e prolattina hanno permesso di determinare il momento dell'ovulazione in tutte le cagne.⁶⁴ Il ruolo delle catecolamine nel controllo del picco preovulatorio di LH è stato studiato più volte ma i risultati sono spesso conflittuali e non si è giunti ad una conclusione univoca.⁶⁶ La dopamina è presente nelle ovaie di alcune specie dove è considerata un precursore locale per la biosintesi della noradrenalina e nel ratto è generalmente accettato che la noradrenalina faciliti il picco preovulatorio dell'LH.^{58,59,67,68} Nella pecora, la dopamina sembra avere un ruolo primario nell'inibire la secrezione di gonadotropine durante la stagione anestrale. Nella cavalla la bromocriptina, che è un agonista della dopamina, non influenza il momento dell'ovulazione, mentre un trattamento con un antagonista della dopamina induce un ritorno anticipato al ciclo estrale.^{69,70,71,72} Nelle scrofe in lattazione, l'uso della bromocriptina riduce costantemente i livelli della concentrazione plasmatica di prolattina, ma i suoi effetti sulla secrezione di LH sono controversi.^{73,74} Alcuni autori non riportano alcuna differenza nella concentrazione di LH dopo la somministrazione della bromocriptina mentre altri riportano una concentrazione inferiore o superiore.^{73,74,75} Ultimamente è stata dimostrata la presenza di una regolazione dopaminergica dell'LH nelle scrofe in lattazione e questa regolazione cambia a seconda della fase di lattazione.⁷⁶ Nelle femmine di ratto ovarioisterectomizzate e in quelle prepuberi la dopamina inibisce il rilascio di LH e gli antagonisti della dopamina inducono una pubertà precoce, mentre nelle ratte adulte, la dopamina aumenta la secrezione di LH.^{77,78}

In conclusione gli effetti della somministrazione degli agonisti della dopamina sulla riproduzione femminile sembra essere inibitoria durante la stagione anestrale nella pecora e nella cavalla, i suoi effetti cambiano nella scrofa durante il periodo dell'allattamento ed ha effetti inibitori nel ratto prepubere ma stimolatori nella ratte adulta. Nella cagna la dopamina ha un effetto stimolatorio in fase anestrale ma non sembra avere nessun effetto nella fase estrale. In questo studio non siamo stati in grado di studiare i livelli plasmatici di FSH a causa

della difficoltà della metodica di determinazione di questo ormone, tuttavia, il numero e la crescita delle strutture follicolari dipendenti dall'FSH erano simili sia negli animali trattati che nei controlli. Inoltre, non ci sono state differenze negli animali trattati ed in quelli di controllo né al momento dell'ovulazione né in qualsiasi altra parte del ciclo estrale. Da questi dati è possibile speculare che la cabergolina non abbia un effetto significativo sulla secrezione dell'FSH durante il ciclo estrale della cagna.^{78,79,80} I livelli plasmatici di LH sia negli animali trattati sia nei controlli sono risultati simili ai valori riscontrati in letteratura e non si sono visti effetti della cabergolina a carico di questo ormone.^{64,81,82} Tra le diverse specie studiate, si sono riscontrate grosse differenze. Nel ratto non sono stati individuati recettori D2 nelle ovaie ed inoltre D2 agonisti ed antagonisti non sono in grado di alterare la steroidogenesi.⁸³ Nella cavalla invece sia i recettori dopaminergici D1 che i D2 sono stati identificati a livello ovarico.⁸⁴ Non ci sono dati riguardanti la specie canina, tuttavia nelle cagne in anaestro, la bromocriptina (un agonista dei recettori D2) è in grado di stimolare la secrezione di FSH e la conseguente follicologenesi e ciò suggerisce che i recettori D2 sono presenti, almeno durante l'anaestro.⁴⁷ Nell'estro, l'assenza di un effetto della cabergolina sullo sviluppo follicolare suggerisce che in fase estrale, anche se sono presenti, i recettori D2 non hanno un effetto importante nel meccanismo endocrino che controlla lo sviluppo follicolare al momento dell'ovulazione. Nella pecora al momento dell'ovulazione si assiste ad un aumento della prolattina plasmatica ed è generalmente accettato che questo sia dovuto ad un aumento del turnover dopaminergico nell'ipotalamo mediobasale durante il proestro.^{25,85,86} Nella cagna i livelli plasmatici di prolattina sono variabili e gli agonisti della dopamina somministrati durante l'anaestro ne riducono i livelli plasmatici.^{48,81,82,87,88,89} Nel nostro lavoro il livello plasmatico della prolattina negli animali di controllo si è mantenuto basso e sostanzialmente invariato durante tutta la fase proestrile ed estrale, come riportato in letteratura.⁸⁹ Negli animali trattati non si sono viste modificazioni significative ed i livelli di prolattina bassi all'inizio del trattamento si sono mantenuti bassi. Se vengono trattate femmine in anaestro che

presentano alti livelli di prolattina, questi livelli plasmatici diminuiscono sensibilmente.^{46,62,90,91} La somministrazione di basse dosi di bromocriptina riduce l'intervallo inter-estrale nelle cagne senza alterare il livello plasmatico di prolattina mentre nel maschio gli agonisti della prolattina sembrano influenzare soprattutto la secrezione supra-basale di prolattina.⁹² In conclusione questi dati indicano che il controllo dei livelli plasmatici di prolattina differiscono a seconda della fase del ciclo riproduttivo e che la prolattina di per se non ha un ruolo prominente nel controllo della follicologenesi e dell'ovulazione nella cagna. Gli agonisti della dopamina sono utilizzati spesso in cagne in anaestro per indurre un estro. Non è chiaro se la somministrazione dovrebbe essere continuata durante il proestro o se la somministrazione durante il proestro possa avere effetti negativi sullo sviluppo follicolare, l'ovulazione o sui livelli ormonali. I dati ottenuti da questo lavoro suggeriscono che la somministrazione prolungata di cabergolina durante il proestro e l'estro, non ha effetto sullo sviluppo follicolare. Tuttavia considerando che la cabergolina potrebbe avere effetti collaterali, risulta sensato interromperne la somministrazione all'inizio del proestro.^{93,94}

**LO SVILUPPO FOLLICOLARE E LA CONCENTRAZIONE PLASMATICA DI LH
E DI PROLATTINA IN CAGNE IN ANESTRO TRATTATE CON CABERGOLINA**



**FOLLICULAR DEVELOPMENT AND PLASMA CONCENTRATIONS OF LH AND
PROLACTIN IN ANESTRUS FEMALE DOG TREATED WITH THE DOPAMINE
AGONIST CABERGOLINE**

Il ciclo estrale della cagna è molto diverso da quello delle femmine delle altre specie di mammiferi, soprattutto per la prolungata fase follicolare e per il fatto che l'ovulazione è seguita da una fase luteinica che ha una durata media di circa 75 giorni.⁹⁵ Al ciclo estrale fa seguito una fase di anaestro non stagionale di durata variabile (4-10 mesi).^{81,95} La conoscenza dei meccanismi che controllano e determinano la fine dell'anaestro e l'inizio di una nuova fase follicolare è scarsa. E' stato osservato che i livelli plasmatici basali di LH tendono ad aumentare ed assumono un andamento pulsatile nel periodo antecedente il proestro e che l'aumento dei livelli circolanti di FSH sembra essere un evento critico nell'iniziare un nuovo ciclo di follicologenesi ovarica.^{47,87,96,97} E' possibile interrompere l'anaestro nella cagna mediante somministrazioni di GnRH, eCG (gonadotropina corionica equina), hCG (gonadotropina corionica umana), LH, FSH, estrogeni o agonisti della dopamina.^{46,63,98,99,100,101} Uno studio preliminare suggerisce che l'inibizione della prolattina sia un requisito fondamentale per l'induzione dell'estro determinata dagli agonisti della dopamina.⁹⁸ Il meccanismo attraverso il quale gli agonisti della dopamina inducono l'estro nella cagna è poco conosciuto. Probabilmente gli agonisti della dopamina inducono lo sviluppo dei follicoli ovarici aumentando la secrezione basale di FSH o aumentando la sensibilizzazione dell'ovaio agli stimoli dell'FSH o dell'LH.⁴⁷ I recettori dopaminergici sono presenti sia a livello ovarico, sia a livello della ghiandola pituitaria e non è ancora stato accertato se gli effetti degli agonisti della dopamina agiscano a livello ipofisario, ovarico o su entrambi. Il tipo e la concentrazione dei recettori dopaminergici differiscono a seconda della specie. Nelle cavalle, sono stati descritti a livello ovarico sia i recettori D1 che i recettori D2.⁸⁴ Nel ratto non sono stati identificati i recettori D2 a livello ovarico e, sia gli agonisti che gli antagonisti dei D2, non alterano la steroidogenesi ovarica in questa specie.⁸³ Non esistono dati riguardanti la cagna. Tuttavia, considerando che la somministrazione di bromocriptina (un agonista dei recettori D2) in cagne in anaestro stimola la secrezione di FSH e la follicologenesi, si suppone che nell'ovaio della cagna siano presenti i recettori D2.⁴⁷ Rispetto

alla bromocriptina, la cabergolina, un alcaloide dopamina agonista dell'ergolina, ha una bioattività superiore, presenta una maggiore affinità con i recettori D2, ed ha una maggiore durata d'azione.^{60,102} In letteratura è riportato che la somministrazione di cabergolina nella cagna in pseudogavidanza diminuisce la concentrazione plasmatica di prolattina ed induce la follicologenesi nella femmina in anaestro.^{46,47,63,90}

In questo capitolo vengono presentati i risultati di uno studio, effettuato in cagne in anaestro, sullo sviluppo follicolare e sulle concentrazioni plasmatiche di LH e prolattina dopo la somministrazione di cabergolina, agonista della dopamina.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato in due replicati, il primo ha coinvolto 13 cagne di razza Beagle, 10 trattate e 3 di controllo, di età compresa tra i 3 ed i 6 anni; il secondo ha preso in considerazione 10 cagne Greyhound, 6 trattate e 4 di controllo, di età compresa tra i 4 e i 6 anni. Lo studio sui Beagle è stato effettuato presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Budapest (HU) e quello sui Greyhound presso la Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma (IT). Tutti gli animali erano in buone condizioni generali, erano tenuti in ampi recinti in parte al chiuso ed in parte all'aria aperta, erano alimentati con diete commerciali con due pasti bilanciati al giorno ed avevano accesso ad libitum all'acqua. L'anamnesi riproduttiva era nota per almeno due anni antecedenti allo studio ed era normale. L'inizio del proestro era riconosciuto tramite un monitoraggio visivo effettuato due volte al giorno mediante il rilievo di uno scolo vaginale sieroso-sanguinolento.^{39,94} L'inizio dell'estro era definito come il primo giorno in cui la cagna accettava il maschio.

Trattamento

La cabergolina è stata somministrata al dosaggio di 5 µg/Kg per os per 4 settimane cominciando tra il novantesimo ed il centesimo giorno dopo la fine dell'estro. Il trattamento è terminato dopo quattro settimane o all'inizio del proestro se questo iniziava durante il periodo

di trattamento.¹⁰³ Per determinare i livelli plasmatici di LH e di prolattina sono stati prelevati campioni di plasma una volta alla settimana nelle tre settimane antecedenti la somministrazione di cabergolina. Dall'inizio della somministrazione della cabergolina, una volta alla settimana per 4 settimane, sono stati eseguiti prelievi ematici ogni 15 minuti per una durata complessiva di 6 ore. Il plasma veniva separato per centrifugazione e congelato a -20 gradi fino al momento della determinazione radioimmunologica.

Esame ecografico

Tutte le cagne sono state sottoposte ad esame ecografico delle ovaie e dell'utero tre volte alla settimana nelle due settimane antecedenti al trattamento, poi, giornalmente, fino alla fine dell'estro. In quattro animali trattati che non hanno mostrato segni di proestro, l'esame ecografico è stato protratto per 14 giorni dopo la fine del trattamento e poi è stato interrotto. L'esame ecografico è stato eseguito con un apparecchio Aloka 500 equipaggiato con una sonda lineare o convex di 7.5 Mhz.⁹⁴ L'attività follicolare è stata classificata in due categorie: nella prima non vi era attività follicolare o vi erano meno di tre follicoli di dimensioni minori di 4 mm e non era presente un ingrossamento ovarico (Fig. 31). Nella seconda, almeno tre follicoli presentavano un diametro superiore ai 4 mm e vi era un ingrossamento ovarico (Fig. 32). Sia il diametro longitudinale che il diametro trasversale erano misurati in ogni esame ecografico e l'ingrossamento ovarico era riconosciuto solo se entrambi i diametri presentavano un incremento superiore al 20 % rispetto alle ecografie eseguite prima dell'inizio del trattamento.

Analisi ormonali

La concentrazione plasmatica di LH è stata determinata utilizzando un sistema radioimmunologico a doppio anticorpo omologo, sviluppato per la pecora e adattato per la

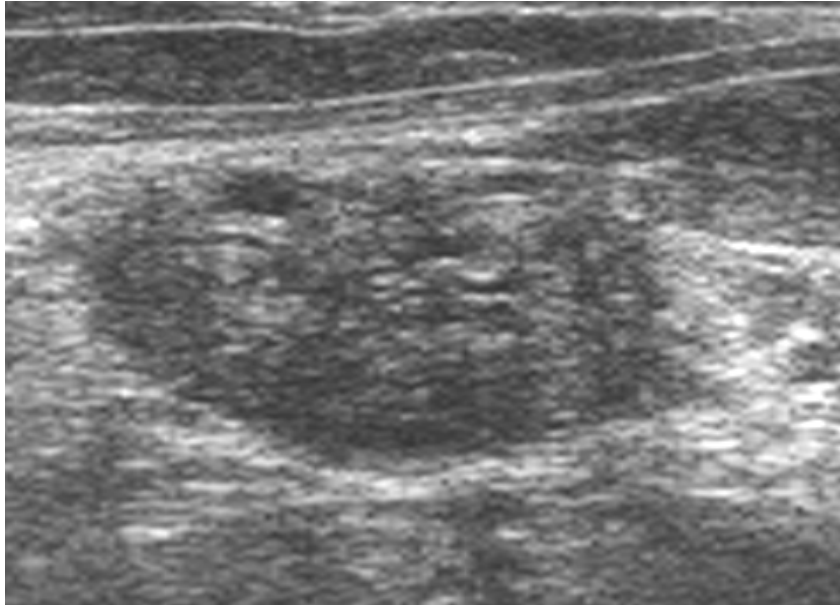


Fig. 31: l'ovaio ha dimensioni ridotte, presenta meno di tre follicoli di diametro inferiore ai 4 mm. Quest'ovaio viene classificato nella prima categoria. (Modificato da Fig. 22)

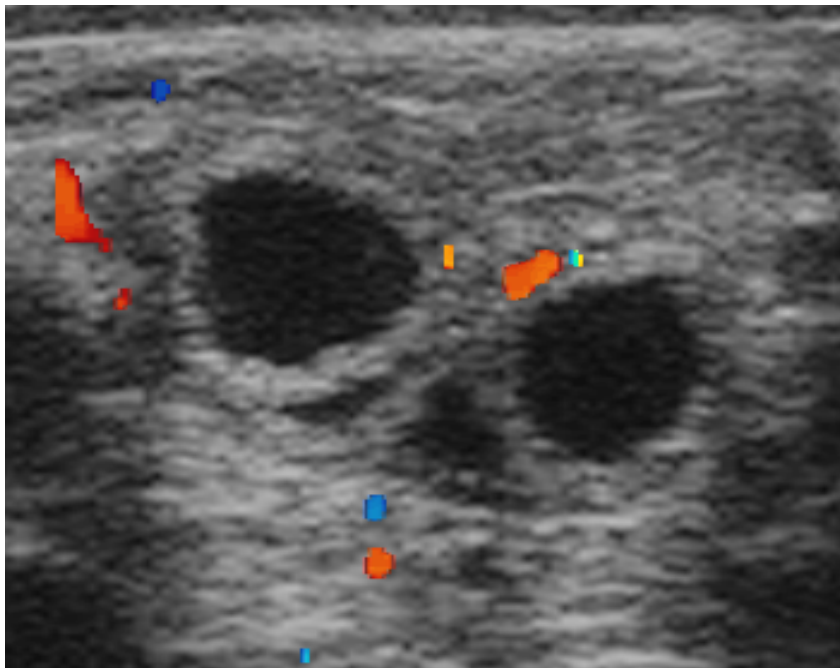


Fig. 32: l'ovaio presenta follicoli di diametro maggiore di 4 mm ed è aumentato di dimensioni. Quest'ovaio viene classificato nella seconda categoria.

cagna, utilizzando reagenti omologhi secondo una tecnica già descritta.¹⁰⁴ La stessa metodica è stata impiegata per la determinazione delle concentrazioni plasmatiche della prolattina.

Analisi statistica

I dati riguardanti il numero di giorni trascorsi tra l'inizio del trattamento e l'inizio del proestro sono stati analizzati con il metodo ANOVA. I dati riguardanti lo sviluppo follicolare, l'ingrossamento ovarico e la proporzione delle cagne che hanno risposto al trattamento sono state analizzati tramite il test Fishers Exact.

RISULTATI

Negli animali trattati, il proestro è stato osservato in 8 Beagle su 10 (80%) ed in 3 Greyhound su 6 (50%), mentre nessun animale di controllo ha presentato il proestro durante il periodo dell'esperimento. L'intervallo inter-estrale è stato di 132 ± 5.0 giorni per i Beagle e di 169 ± 7.0 per i Greyhound trattati. Questi valori sono significativamente diversi rispetto agli intervalli inter-estrali precedenti degli stessi animali (192 ± 9.0 e 198 ± 12.0 giorni rispettivamente nei Beagle e nei Greyhound) ed in confronto agli animali di controllo (192 ± 10 e 198 ± 12). Negli animali che hanno risposto al trattamento, l'intervallo tra l'inizio del trattamento ed il proestro è stato simile per i cani della stessa razza ma diverso tra le due razze, (13.3 ± 1.9 giorni nei Beagle e 20.3 ± 1.70 giorni nei Greyhound). La durata del proestro è risultata prolungata negli animali trattati con cabergolina rispetto ai cicli precedenti (10.6 ± 0.50 e 11.7 ± 0.50 giorni rispettivamente nei Beagle e nei Greyhound) e rispetto ai controlli (8.4 ± 0.30 e 8.8 ± 0.40 giorni). La durata dell'estro è stata simile negli animali trattati ed i controlli (8.9 ± 0.90 e 8.60 ± 0.40 giorni) e rispetto ai cicli precedenti al trattamento (8.6 ± 0.40 e 8.0 ± 0.20)

Attività ovarica

L'aumento delle dimensioni delle ovaie e lo sviluppo dei follicoli è stato riscontrato nella maggioranza dei Beagle (9 su 10) e dei Greyhound (5 su 6) tra la seconda e la terza settimana di trattamento, ma solo 8 su 10 Beagle e 4 su 6 Greyhound hanno mostrato i segni del calore. Nei Beagle che hanno risposto al trattamento l'intervallo medio tra la somministrazione di cabergolina e la comparsa di follicoli in classe 2 è stato di 8.0 ± 0.2 giorni, e nei Greyhound trattati, l'intervallo è stato di 12.0 ± 0.3 giorni.

Livelli plasmatici di LH e prolattina

Nelle cagne trattate si è verificato un aumento della concentrazione plasmatica di LH da poco prima del proestro a poco dopo la fine del proestro. Nelle cagne di controllo i livelli medi di LH all'inizio dello studio erano bassi e non hanno subito variazioni durante il periodo considerato. I livelli plasmatici di prolattina erano molto variabili in tutti gli animali, con la tendenza a valori di prolattina più bassi negli animali trattati.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio concordano con dati precedenti che dimostrano che gli agonisti della dopamina somministrati in cagne in anaestro sono capaci di ridurre in modo significativo l'intervallo inter-estrale.^{46,63,98,99} La durata del proestro è aumentata in tutti i cani trattati che hanno risposto al trattamento, sia rispetto ai cicli antecedenti al trattamento nello stesso animale, sia rispetto agli animali di controllo. A questo riguardo non ci sono dati simili pubblicati in letteratura. La durata del proestro è risultata più lunga nelle cagne di razza Greyhound trattate rispetto alle cagne di razza Beagle. Nei Greyhound si è notato un intervallo temporale maggiore per consentire lo sviluppo di follicoli ovarici di dimensioni superiori ai 4 mm. Non sono chiari i motivi responsabili di queste differenze in quanto i dosaggi e le modalità di somministrazione del farmaco sono stati identici. La differenza

potrebbe, quindi, essere dovuta a differenze intrinseche per ciascuna razza (Beagle versus Greyhound). Per quanto riguarda i livelli plasmatici di LH e prolattina nelle due razze questi sono risultati identici e quindi possiamo concludere che questi ormoni non sono stati la causa delle differenze nella risposta al trattamento con cabergolina. L'FSH svolge un ruolo fondamentale nel dare inizio alla follicologenesi, e per questo si è cercato di mettere a punto una metodica per poter rilevare i livelli plasmatici di questo ormone. Sfortunatamente il nostro tentativo di sviluppare una metodica per testare i livelli plasmatici di FSH non ha avuto successo e non siamo stati in grado di misurare le concentrazioni di FSH in questi animali.^{47,105} Nel nostro studio, il trattamento con cabergolina non ha soppresso i livelli plasmatici di prolattina, forse perché i livelli di questo ormone erano già bassi all'inizio del trattamento oppure per l'elevata variabilità dei livelli di questo ormone che potrebbe avere mascherato un'effettiva soppressione. La presenza di un'elevata variabilità dei livelli plasmatici della prolattina è stata documentata anche in precedenti lavori.^{106,107} Bassi dosaggi di bromocriptina possono ridurre l'intervallo inter-estrale senza abbassarne i livelli di prolattina plasmatica, ed in uno studio riguardante cani maschi, si è osservato che gli agonisti della dopamina hanno effetto soprattutto sulla secrezione suprabasale della prolattina.^{92,108} Queste osservazioni differiscono da altri lavori dove la somministrazione di agonisti della dopamina in cagne in anaestro ha causato una diminuzione dei livelli plasmatici della prolattina.^{46,62,90,91} Le differenze tra i risultati di questi studi potrebbero essere ricercate nel tipo di agonista della dopamina utilizzato, nelle dosi somministrate o nei differenti protocolli sperimentali. Tutti i dati a disposizione indicano che il controllo dei livelli plasmatici della prolattina differisce a seconda dello stato riproduttivo dell'animale e che la prolattina non ha un ruolo principale nel controllo della follicologenesi nella cagna. Nelle cagne trattate i livelli plasmatici di LH sono aumentati prima dell'inizio del proestro, questo presuppone una riduzione dell'inibizione della secrezione di LH verso la fine dell'anaestro. Il meccanismo di controllo della secrezione dell'LH durante l'anaestro non è noto, tuttavia, dal momento che la

cabergolina è in grado di ridurre l'intervallo inter-estrale, si suppone che il sistema dopaminergico abbia un ruolo in questa fase. Uno studio effettuato su cagne in anaestro, riporta che l'area sotto la curva (ROI) dell'LH aumenta, 28 giorni dopo l'inizio della somministrazione di bromocriptina, anche se non si rilevano differenze nei livelli plasmatici medi della concentrazione di LH.⁴⁷ Questi dati ed i nostri risultati che riscontrano un aumento del livello plasmatico medio di LH subito prima dell'inizio del proestro, indicano che il trattamento con agonisti della dopamina stimola la secrezione di LH o riduce gli effetti di fattori inibitori sconosciuti. Il fatto che l'attività follicolare sia aumentata prima dell'inizio del proestro, suggerisce che l'aumento dell'LH è un prerequisito necessario per la fine dell'anaestro. Infatti la somministrazione di GnRH e LH in cagne in anaestro è in grado di indurre l'estro.^{109,110} L'aumento dei livelli plasmatici medi di LH e l'assenza degli effetti della cabergolina sulle concentrazioni plasmatiche della prolattina, supporta ulteriormente l'osservazione di alcuni Autori che affermano che nelle cagne, l'induzione dello sviluppo follicolare non è iniziato dalla soppressione della secrezione della prolattina, ma da altri effetti dopaminergici diretti o indiretti sull'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio).^{47,87} In ogni modo non è ancora noto se questi effetti agiscano a livello ipotalamico, ovarico o su entrambi. Non ci sono studi che abbiano valutato la presenza di recettori dopaminergici nell'ovaio canino, tuttavia nella donna, nella cavalla e nella femmina del ratto, è stata dimostrata la presenza dei recettori dopaminergici.^{83,84,111}

Le conclusioni di questo studio sono che la somministrazione di agonisti della dopamina, quali la cabergolina, in cagne in anaestro, aumentano i livelli plasmatici di LH ed inducono lo sviluppo follicolare subito prima dell'insorgenza del proestro in un'elevata percentuale (70%) degli animali trattati. Tuttavia questo proestro non è sempre seguito da un estro. Infine la prolattina di *per se* non ha un ruolo principale nel controllo della follicologenesi nelle cagne durante la transizione da anaestro ad estro.

**STUDIO DELLA PERFUSIONE OVARICA DELLA CAGNA DURANTE IL CICLO
ESTRALE TRAMITE METODICHE DOPPLER**



**A DOPPLER ULTRASONOGRAPHIC STUDY OF CYCLIC CHANGES OF
OVARIAN PERFUSION**

Il ciclo estrale della cagna è caratterizzato clinicamente dall'ipertrofia dei genitali esterni, citologicamente dalla cheratinizzazione dell'epitelio vaginale e metabolicamente da variazioni ormonali endocrine.¹¹² Le variazioni ormonali sono strettamente correlate alla perfusione sanguigna ovarica, tanto che nelle fasi di massima attività endocrina l'ovaio risulta essere l'organo maggiormente perfuso.¹¹³ Studi istologici hanno dimostrato che in molte specie di mammiferi la vascolarizzazione delle ovaie subisce cambiamenti ciclici che sono strettamente correlabili allo stato funzionale delle gonadi femminili.¹¹⁴ Nella donna, nella cavalla e nella bovina, la vascolarizzazione follicolare ed il supporto ematico a ciascun follicolo rappresentano fattori critici nel determinare se il follicolo sarà in grado di ovulare.¹¹⁵ L'esame ecografico bidimensionale permette di monitorare in tempo reale l'evoluzione anatomica dei follicoli e dell'ovaio durante le diverse fasi del ciclo estrale, tuttavia non fornisce indicazioni sullo stato funzionale e sull'attività del tessuto follicolare.⁴⁴ I primi studi riguardanti la vascolarizzazione ovarica utilizzavano metodiche invasive, non applicabili nella pratica clinica.¹¹³ Gli attuali sviluppi della tecnologia Doppler applicata all'ultrasonografia clinica, permettono di studiare in modo accurato e non invasivo, sia il flusso ematico, sia le variazioni dello stesso in funzione della fase del ciclo estrale. In medicina umana sono numerosissimi i riferimenti bibliografici riguardanti lo studio ecografico vascolare delle ovaie della donna e l'ecodoppler rappresenta un esame di routine nello studio della fertilità femminile. Data la difficoltà dell'applicazione del sistema ecodoppler in medicina veterinaria, sono stati pubblicati pochissimi lavori riguardanti questo argomento, e uno solo riguarda la specie canina.^{116,117,118} Lo scopo del presente studio è stato quello di standardizzare la metodica Doppler della vascolarizzazione ovarica canina, in modo da correlare la perfusione ovarica con lo stato funzionale endocrino dell'ovaio.

MATERIALI E METODI

Una cagna di razza Greyhound, clinicamente in buone condizioni di salute, con anamnesi riproduttiva nota, è stata studiata per 5 cicli estrali consecutivi, dall'età di 5 anni fino all'età di 8 anni.

Esame ecografico

L'esame ecografico è stato eseguito giornalmente dal primo giorno dal rilevamento del proestro fino al giorno in cui la citologia vaginale segnalava l'inizio del metaestro, poi ad intervalli settimanali fino a 40 giorni dopo l'inizio dell'estro. Durante il proestro l'attività follicolare è stata monitorata giornalmente attraverso l'esame della citologia vaginale ed attraverso lo sviluppo follicolare ecografico.^{44,112} L'esame ecografico è stato effettuato con l'apparecchio MyLabVet30 (Esaote) equipaggiato con sonda microconvex multifrequenza impostata ad 8 MHz (CA123) e sonda lineare multifrequenza impostata a 12 MHz (LA232), inoltre, dotato di metodica Color Doppler (CD) e Doppler Pulsato Spettrale (PW). L'ovaio è stato identificato seguendo l'approccio precedentemente descritto.⁴⁴ Lo studio della perfusione ovarica è iniziato con l'applicazione del CD all'immagine bidimensionale dell'ovaio e con l'individuazione del piano di scansione con la maggiore vascolarizzazione e con il migliore segnale doppler. Una volta individuato il miglior piano di scansione, è stato ottimizzato il settaggio del segnale del colore in modo da elevare il limite di Nyquist ed evitare artefatti di aliasing. I gains ed i filtri di parete sono stati impostati in modo da avere un segnale di colore che riempie completamente il vaso in esame. Per l'analisi quantitativa con il PW sono stati considerati solo i frames che hanno un buon flusso arterioso con almeno tre cicli cardiaci consecutivi di buona qualità e che hanno mostrato la massima variazione del segnale Doppler (Fig. 33). Il gate di campionamento del PW ha compreso il diametro massimo del vaso in esame e sono stati considerati i cicli nei quali il cane era a fine espirazione o in apnea, in modo da non avere artefatti respiratori sul tracciato da analizzare.

Gli angoli di insonazione sono stati selezionati con una correzione manuale e sono stati scartati gli angoli superiori ai 60 gradi. Sui frames selezionati, sono stati calcolati il picco di velocità sistolica (SPV) e diastolica (DPV), la velocità a fine diastole (EDV) e l'indice di resistività (RI) (Fig. 34). Ogni indagine ecografica è consistita nell'ottenere almeno tre tracciati spettrali PW con le sopracitate caratteristiche per ogni ovaio esaminato.

Analisi statistica

I dati riguardanti le misurazioni effettuate sulle immagini del Doppler spettrale sono state analizzati tramite il Bonferroni Multiple Comparison Test.

RISULTATI

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative nella perfusione sanguigna delle due ovaie. Nei primissimi giorni del proestro, la vascolarizzazione ovarica è risultata scarsa, anche impostando il limite di Niquist ai livelli più bassi per aumentare la sensibilità del CD. Con il progredire del proestro, il numero, le dimensioni e l'intensità dei pixel colorati all'interno dei vasi sono aumentati. Anche la velocità massima ed il doppler shift misurabili con il PW sono aumentati gradualmente per tutto il proestro. Durante la fase follicolare (da metà a fine proestro), le velocità dei flussi sono aumentate gradualmente, ma l'indice di resistività (RI) è rimasto costante o è diminuito solo in maniera modesta e non in modo statisticamente significativo. Durante il periodo pre-ovulatorio, si è stato riscontrato un rapido aumento dei pixel di colore nelle immagini. Le analisi quantitative del flusso sanguigno ovarico hanno registrato un aumento del SPV, DPV e EDV, ma il RI è rimasto costante. Il pattern del flusso preovulatorio ha mostrato una velocità SPV alta, un'incisura prediastolica non più evidente, ed una riduzione lenta e graduale di fine diastole. Questo pattern è risultato caratteristico del periodo dell'ovulazione in tutti i cicli esaminati. Al momento

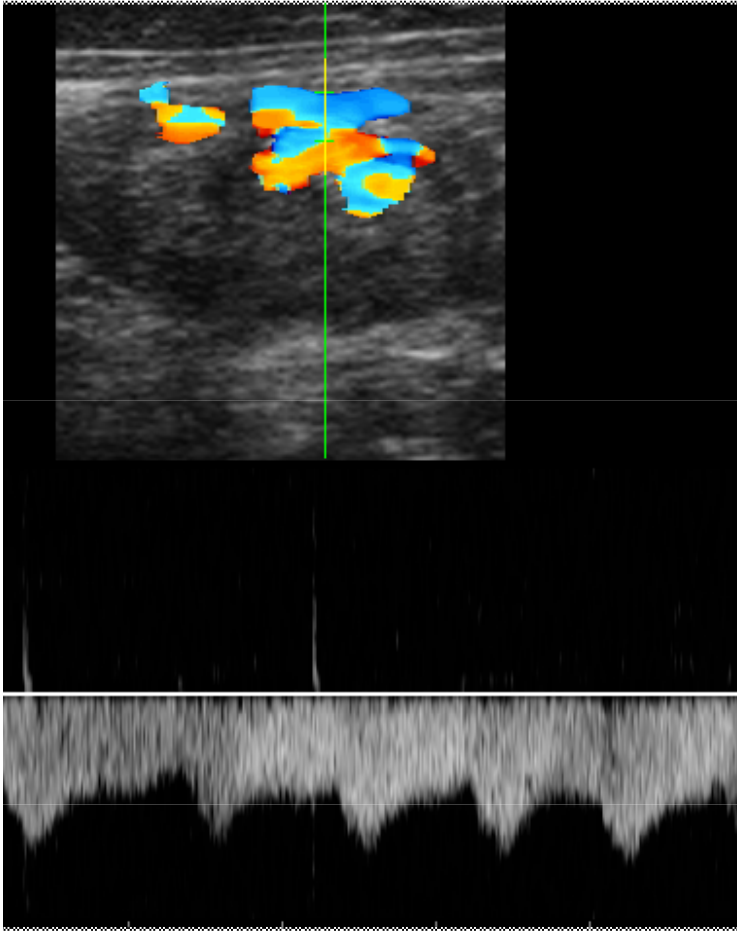


Fig. 33: tramite il CD si seleziona il vaso da campionare, poi si applica il PW fino a che si ottengono tracciati con almeno tre cicli cardiaci consecutivi di buona qualità

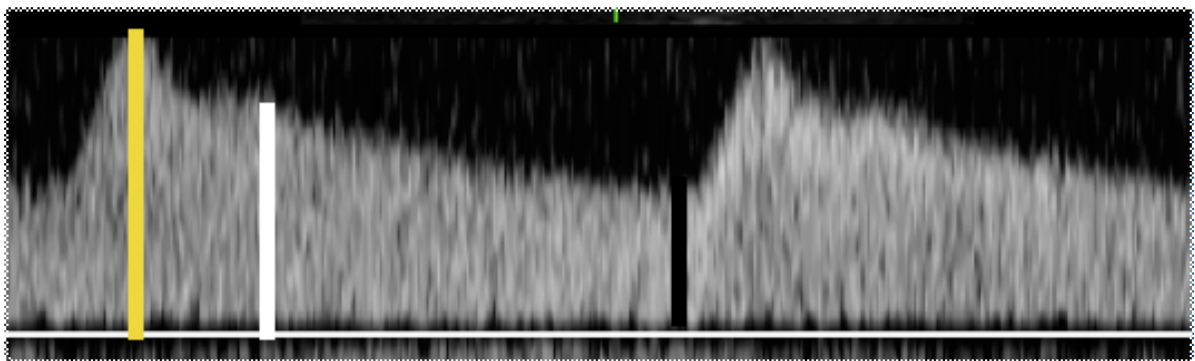


Fig. 34: PW del flusso ovarico. Il primo picco (contrassegnato con la linea gialla, rappresenta l'SPV, il secondo picco contrassegnato con la linea bianca è il DPV. La terza linea nera rappresenta l'EDV. Per calcolare l'RI è necessario sottrarre l'EDV all'SPV e dividere il risultato per l'SPV.

dell'ovulazione e nelle seguenti 48 ore, nella fase di luteinizzazione, sono state misurate le velocità di flusso maggiori. Alcuni giorni dopo l'ovulazione, i parametri doppler hanno cominciato gradualmente a diminuire più lentamente rispetto alla velocità con cui sono aumentati nel proestro. Nel periodo post-calore, nella prima fase del metaestro, è stata registrata una graduale diminuzione del flusso ovarico e del numero dei vasi sanguigni rilevabili con il CD.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno dimostrato, nel corso del ciclo estrale nella cagna, notevoli variazioni nel flusso sanguigno intra-ovarico e, che queste variazioni sono ripetibili per ogni ciclo estrale. Uno studio precedente, aveva preso in considerazione l'ipotesi che le variazioni emodinamiche fossero essenziali per il funzionamento del tessuto riproduttivo.^{44,113} L'aumentata vascolarizzazione ovarica nella fase follicoligenica è stata attribuita a fattori di crescita angiogenici che vengono prodotti dalle cellule proliferanti delle pareti vascolari e stimolati dalle gonadotropine.¹¹⁹ Nel periodo pre-ovulatorio si è verificato un aumento qualitativo e soggettivo del CD e l'analisi quantitativa, ha dimostrato un'aumento statisticamente significativo dell'SPV, DPV, EDV, ed un tendenziale ma non statisticamente significativo ribasso del RI. La riduzione del RI per un aumento del EDV ha indicato una diminuzione delle resistenze vascolari.¹²⁰ E' stato dimostrato che l'apporto ematico all'ovaio è fondamentale nella fase di luteinizzazione dei follicoli. Oltre all'angiogenesi, l'LH induce una vasodilatazione marcata delle arterie ed arteriole presenti nella parete follicolare in proliferazione, azione mediata da sostanze vasoattive quali gli eicosanoidi, le chinine e le prostaglandine. Dal momento che i vasi neoformati sono vasi sinusoidali che non hanno uno strato di muscolatura liscia a livello parietale, non sono soggetti a vasocostrizioni che potrebbero ostacolare la perfusione tissutale.¹²¹ L'incremento del flusso sanguigno ovarico, aumenta l'apporto di nutrienti e di ossigeno ai follicoli preovulatori: questi fattori sono stati

essenziali per il processo ovulatorio e l'inizio della produzione di progesterone.¹¹³ Immediatamente dopo l'ovulazione, è stata registrata la massima perfusione ovarica. Questo dato concorda con la letteratura in quanto la luteinizzazione del follicolo e la produzione del progesterone coincidono con le massime esigenze ematiche dell'ovaio. Mano a mano che ci si allontana dall'ovulazione, il parenchima ovarico comincia a regredire e si è assistito ad una diminuzione della perfusione ovarica. Nella donna è stata dimostrata una stretta correlazione tra la perfusione ovarica monitorata con le metodiche doppler e l'attività endocrina, ed il doppler ovarico è comunemente utilizzato per valutare l'ovaio dominante e quello a riposo.¹²² Nella bovina da latte, il follicolo che diverrà il dominante è quello più vascolarizzato.¹¹⁷ Il nostro studio ha dimostrato che i cambiamenti di perfusione ovarica sono ciclici, ripetibili e statisticamente molto simili tra loro nella stessa cagna. Un precedente lavoro ha rilevato che i cambiamenti di perfusione ovarica sono ciclici e statisticamente ripetibili tra cagne diverse. Tuttavia come nella specie umana, è importante correlare i dati della perfusione ovarica con i livelli plasmatici di progesterone e con la citologia vaginale.¹¹⁵ Va sottolineato che la metodica doppler può essere soggetta ad errori di calcolo correlati all'angolo di inclinazione tra il vaso in esame ed il fascio ultrasonoro. Questi errori possono essere ridotti e corretti da un operatore esperto. Nelle fasi del ciclo estrale nelle quali si assiste ad un aumento di perfusione ovarica, si verifica un simultaneo e quasi parallelo aumento sia dell'SVD che dell'EDV. Questo mantiene l'RI costante e lo rende inutile nel differenziare le diverse fasi estrali. L'unico momento in cui si verifica una tendenziale riduzione di questo indice, anche se statisticamente non significativa, è nella fase che segue l'ovulazione. Lo studio dei cambiamenti fisiologici della perfusione ovarica durante il ciclo estrale, offre le basi per una migliore conoscenza della funzionalità ovarica. Tuttavia sono necessari altri studi per definire la validità di questa tecnica e confermare la stretta correlazione tra livelli di perfusione ovarica e dosaggi ormonali plasmatici, già dimostrata nella donna.

DISCUSSIONE GENERALE E CONCLUSIONI



GENERAL DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Nella prima parte della tesi abbiamo descritto le conoscenze fisiche e tecniche di base necessarie per poter utilizzare l'ecografia e le metodiche doppler ad essa correlate, necessarie per non essere tratti in errore dai molteplici artefatti che l'ultrasonografia genera. Queste conoscenze sono state fondamentali per poter standardizzare la tecnica ecografica che permette di individuare e studiare le ovaie della cagna nelle diverse fasi del ciclo estrale. Questa tecnica, è stata utilizzata come base operativa per le ricerche successive. Una volta acquisita la necessaria esperienza sull'aspetto fisiologico del ciclo estrale, abbiamo iniziato a studiare gli effetti della cabergolina, un agonista della dopamina, relativamente all'aspetto ecografico ed ormonale delle ovaie in cagne sane.

Il primo studio intrapreso, ha dimostrato che la somministrazione prolungata di cabergolina durante il proestro e l'estro, non ha effetto sullo sviluppo follicolare ovarico. I livelli plasmatici di LH, sia negli animali trattati sia nei controlli, sono risultati simili ai valori riscontrati in letteratura e non si sono osservati effetti della cabergolina a carico di questo ormone, né a carico dei livelli di prolattina che erano bassi all'inizio del trattamento e si sono mantenuti bassi durante lo studio.

Nella seconda ricerca, abbiamo invece studiato l'effetto della cabergolina somministrata a cagne in anaestro. Questa ricerca ha dimostrato che la somministrazione di cabergolina in cagne in anaestro, aumenta i livelli plasmatici di LH ed induce lo sviluppo follicolare ovarico e l'insorgenza del proestro nel 70% degli animali trattati. Durante i controlli ecografici, ripetuti sulle ovaie delle cagne utilizzate per entrambe le ricerche, abbiamo notato un notevole aumento della vascolarizzazione delle ovaie degli animali che si apprestavano al calore.

In considerazione della ricca letteratura in campo umano riguardante la vascolarizzazione ovarica, abbiamo pensato di intraprendere un'ulteriore ricerca che ha avuto l'obiettivo di standardizzare lo studio ecodoppler con CD e PW della perfusione ovarica. Questo studio ha dimostrato che i cambiamenti di perfusione ovarica sono ciclici, ripetibili e statisticamente molto simili tra loro nella stessa cagna. Un precedente lavoro ha dimostrato che i cambiamenti

di perfusione ovarica sono ciclici e statisticamente ripetibili tra cagne diverse.¹¹⁷ Tuttavia, come nella specie umana, è importante correlare i dati della perfusione ovarica con i livelli plasmatici di progesterone e con la citologia vaginale.

In conclusione i dati ottenuti dalle ricerche sopracitate, oggetto della tesi, aprono diversi campi di indagine per approfondire gli studi della stretta correlazione tra vascolarizzazione ovarica e produzione ormonale, settore molto studiato in medicina umana in quanto strettamente correlato all'ipofertilità.

BIBLIOGRAFIA:

- 1) Kirberger RM: Imaging artifacts in diagnostic ultrasound--A review. *Vet Rad & Ultrasound*, vol 36: 297-306, 1995
- 2) Reef VB: Artifacts. In: Reef VB: *Equine diagnostic ultrasound*. WB Saunders Co, pp: 24-38, 1998
- 3) Kremkau FW: Artifacts. In: Kremkau FW: *Diagnostic ultrasound: principles and instruments*. WB Saunders Co, sixth edition, pp: 273-311, 2002
- 4) Curry TS, Dowdey JE, Murry RC. In: Curry TS, Dowdey JE, Murry RC: *Christensen's Physics of Radiology*. Lea & Febiger, fourth edition, pp: 323-371, 1990
- 5) Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, Boone JM: Ultrasound. In: Bushberg JT, Seibert JA, Leidholdt EM, Boone JM: *The Essential Physics of Medical Imaging*. Williams & Wilkins, second edition, pp 469-555, 2002
- 6) Penninck DG: Imaging artifacts in ultrasound. In: Nyland TG, Mattoon JS: *Small animal diagnostic ultrasound*. WB Saunders Co, second edition, 2002
- 7) Tyrrell B, Beck C: Survey of the use of radiography vs. ultrasonography in the investigation of gastrointestinal foreign bodies in small animals. *Vet Rad & Ultrasound*, vol 47: 404-408, 2006
- 8) Kremkau FW, Taylor KJW: Artifacts in Ultrasound Imaging. *J Ultrasound Med*, (5): 227-37, 1986
- 9) Drost TW: Basic Ultrasound Physics. In Thrall: *Textbook of veterinary diagnostic radiology*, WB Saunders Co, fifth edition, pp ed,5. Saunders elsevier, pp 38-49, 2007
- 10) Lamb CR, Boswood A: An artifact resulting from propagation speed error. *Vet Rad & Ultrasound*, vol 36: 549-550, 1995

- 11) Barthez PY, Leveille R, Scrivani PV: Side lobe and grating artifacts in ultrasound imaging. *Vet Rad & Ultrasound*, vol 38: 387-393, 1997
- 12) Spattini G: Gli artefatti in ecografia veterinaria: come riconoscerli e correggerli. *Veterinaria*, 22 (1): 9-20, 2008
- 13) Kollmann C, Turetschek K, Mostbeck G: Amplitude-coded colour doppler sonography: physical principles and technique. *Eur Radiol* 8(4): 649-56. 1998
- 14) Derchi LE, Martinoli C, Solbiati L, Rizzatto G: Power Doppler: physical and constructive principles and comparison with Doppler Color. *Radiol Med* Apr 93(4): 329-35. 1997
- 15) Healy DA, Thiele BL, Neumyer MM: Current applications of duplex ultrasonography and color Doppler imaging. *J Cardiovasc Surg (Torino)* Oct: 35(5):403-12. 1994
- 16) Ginther OJ: Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Cross Plains, Wis. Equine Services, 1986
- 17) Pierson RA, Ginther OJ: Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, 29: 21-37, 1988
- 18) Soede NM, Noordhuizen JPTM, Kemp B: The duration of ovulation in pigs, studied by transrectal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. *Theriogenology*, 38: 653-666, 1992
- 19) Barr FJ: The use of ultrasound in the dog. In Grunsell GSG, raw ME, Hill FWG (eds). *The Veterinary Annual*, 28th issue, Boston, Sientechnica, 142-148, 1988
- 20) Wrigley RH, Finn ST: Ultrasonography of canine uterus and ovary. In Kirk RW (ed): *Current Veterinary Therapy X*. Philadelphia, WB Saunders, 1239-1242, 1989
- 21) England GCW, Allen WE: The ultrasonographic and histological appearance of the canine ovary. *Veterinary Record* 123, 555-556, 1989b
- 22) Engalnd CGW, Yeager AE: Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J. Reprod. Fert.*, 43(suppl) 107-117, 1993

- 23) Rivers B, Johnson GR: Diagnostic imaging of the reproductive organs in the bitch. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 21: 437-466, 1991
- 24) Silva LDM, Onclin K, Verstegen JP: Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Vet Rad & ultras* 37: 313-320, 1996
- 25) Wallace SS, Mahafey MB, Miller DM, Thompson FN, Prabir KC: Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrus cycle. *Am J Vet Res*, 53: 209-215, 1992
- 26) Inaba T, Matsui N, Shimazu R: Use of echography in bitches for detection of ovulation and pregnancy. *Vet Rec* 115: 276-280, 1984
- 27) Soede NM, Hazelenger W, Kemp B: Follicle size and the process of ovulation in sows as studied with ultrasound. *Reproduction in Domestic Animals*, 33: 3-4, 239-244, 1998
- 28) Boyd JS, Renton JP, Harvey MJA, Nickson DA, Eckersall PD, Ferguson JM: Problems associated with ultrasonography of the canine ovary around the time of ovulation. *J Repr Fert* 47: 101-105, 1993
- 29) England GCW, Allen WE: The ultrasonographic and histological appearance of the canine ovary. *J Reprod Fert, Supplement* 39: 91-100, 1989a
- 30) Hayer P, Gunzel-Appel AR, Luerssen D, Hoppen HO: Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J Reprod Fert Supplement* 47: 93-100, 1993
- 31) Tsutsui T. Studies on the reproduction in the dog. VI. Ovulation rate and transuterine migration of the fertilised ova. *Jpn J Anim Reprod* 21: 98-101, 1975
- 32) Concannon PW: Canine physiology of reproduction. In: *Small animal reproduction and infertility*. Philadelphia: Lea and Febiger (eds), 23-77, 1986a

- 33) Lein DH. Infertility and reproductive diseases in bitches and queens. In: Roberts SJ (eds) Veterinary obstetrics and genital diseases, Theriogenology. 3rd ed. Woodstock, Vermont: SJ Roberts, 675-683, 1986
- 34) Concannon PW, McCann JP, Temple M: Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. J. Reprod. Fert., (Suppl) 39: 3-26, 1989
- 35) Concannon PW, Whaley S, Lein D: Canine gestation length: variation related in time of mating and fertile life of sperm. Am J Vet Res 44:1819-1824, 1983
- 36) Concannon PW, Hansel, W, McEntee K: Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with preovulatory luteinization in the bitch. Biol Reprod 17: 604-613, 1977
- 37) Concannon PW: Canine pregnancy and parturition. Vet Clin North Am Small Anim Pract 16: 453-475, 1986b
- 38) Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, Schoemaker J: Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone during different phases of the oestrus cycle and anestrus in beagle bitches. Biol of Reprod, 60: 65-71, 1999
- 39) Zoldag L, Fekete S, Csaky I. Bersenyi A: Fertile estrus induced in bitches by bromocriptine, a dopamine agonist: a clinical trial. Theriogenology, 55: 1657-1666, 2001
- 40) Tsutsui T: Gamete physiology and timing of ovulation and fertilisation in dogs (Suppl) 39: 269-273, 1989
- 41) Fontbonne A, Buff S, Garnier F: Recenti dati di fisiologia ed endocrinologia sessuale nella specie canina. Summa, 2: 17-22, 2001
- 42) Fontbonne A, Buff S, Lepercq MF: Artificial insemination with frozen semen in the bitch: influence of progesterone level, inseminating dose and number of insemination performed in the same bitch, 4th International Symposium in Canine and Feline Reproduction, Oslo, 2002

- 43) Wildt DE, Panko WB, Chakraborty PK, Seager SWJ: Relationship of serum estrone, estradiol 17beta and progesterone to LH, sexual behaviour and time of ovulation in the bitch. *Bio of Reprod* 20: 648-658, 1979
- 44) Spattini G, Giaconella R, De Rensis F: L'indagine ecografica dell'attività ovarica nella cagna durante il ciclo estrale. *Veterinaria* 17 (2): 1-6, 2003
- 45) Okkens AC, Bevers MM, Dieleman SJ, Willemse AH: Shortening of the interoestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment. *Vet Q* 7: 173-6, 1985
- 46) Verstegen JP, Onclin K, Silva LDM, Concannon PW: Effect of stage of anoestrus on the induction of estrus by the dopamine agonist Cabergoline in dogs. *Theriogenology* 51: 597-611, 1999
- 47) Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, van Haften B, Dieleman SJ, et al: Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle stimulating hormone in beagle bitches. *J Reprod Fert* 117: 387-93, 1999
- 48) Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, et al: A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5: 459-78, 1993
- 49) Campbell BC, Dobson H, Baird DT, Scaramuzzi RJ: Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. *J Reprod Fertil* 117: 355-67, 1999
- 50) Kermabon AY, Belair L, Theau-Clement M, Salesse R, Djiane J: Effects of anoestrus and bromocriptine treatment on the expression of prolactin and LH receptors in the rabbit ovary during lactation. *J Reprod Fert* 102: 131-8, 1994

- 51) Advis JP, Richards JS, Ojeda SR: Hyperprolactinemia-induced precocious puberty: studies on the mechanism(s) by which prolactin enhances ovarian progesterone responsiveness to gonadotropins in prepubertal rats. *Endocrinology* 108: 1333–42, 1981
- 52) Kawagoe S, Hiroi M: Further evidence that prolactin controls the prepubertal sexual development in the female rat. *Gynaecol Obstet Invest* 27: 197–200, 1989
- 53) Picazo RA, Gonzales de Bulnes A, Gomez Brunet A, del Campo A, Granados B, Tresguerres J, et al: Effects of bromocriptine administration during the follicular phase of the oestrus cycle on prolactin and gonadotrophin secretion and follicular dynamics in Merino monovular ewes. *J Reprod Fert* 120: 77–186, 2000
- 54) Tsai-Morris CH, Ghosh M, Hirshfield AN, Wise PM, Brodie AM: Inhibition of ovarian aromatase by prolactin in vivo. *Biol Reprod* 29: 342–6, 1983
- 55) Dusza L, Ciereszko R, Okrasa S, Kotwica G: Prolactin administration during the follicular phase of cyclic sows. *Animal Reprod Sci* 34: 147–58, 1993
- 56) McNatty KP, Sawers RS, McNeilly AS: A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature Lond* 50:635–55, 1974
- 57) Veldhuis JD, Klase P, Hammond JM: Divergent effect of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: influence of cytodifferentiation. *Endocrinology* 107:42–6, 1980
- 58) McNeilly AS, Glasier A, Jonassen J, Howie PW: Evidence for a direct inhibition of ovarian function by prolactin. *J Reprod Fert* 65:559–69, 1982
- 59) Kotwica J, Skorzynsku D, Bongaki M, Miszkiel G: Influence of dopamine as noradrenaline precursor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *Br J Pharmacol* 118: 1669–874, 1996
- 60) Di Salle E, Ornati G, Briatico G: FCE 21336 a new ergoline derivate with a potent and longacting lowering effect on prolactin secretion in rats. *J Endocrinol Invest* 103(Suppl): 45, 1983

- 61) Di Salle E, Ornati G, Giudici G, Briatico G: Prolactin lowering effect of a new ergoline derivate, FCE 21336 in the rat: a comparison with bromocriptine. *Acta Endocrinol* 103(Suppl):265, 1983
- 62) Jochle W, Arbeuter K, Post K, Ballabio R, D'Ver AS. Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrus intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats. *J Reprod Fert* 39 (Suppl):199–207, 1989
- 63) Jeukenne P, Verstagen J: Termination of dioestrus and induction of oestrus in dioestrus non-pregnant bitches by prolactin antagonist Cabergoline. *J Reprod Fert* 51(Suppl):59–66, 1997
- 64) Hase M, Hory T, Kawakami E, TsuiTsui T. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by an ultrasonographic diagnosis system in the dog. *J Vet Med Sci* 62:243–8, 2000
- 65) Rowley J: Cystic ovary in a dog: a case report. *Vet Med Small Anim Clin* 75:1888, 1989
- 66) Barraclough CA, Wise PM: The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 3:91–119, 1982
- 67) Bahr J, Ben-Jonatan N: Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation. *Endocrinology* 177: 620–3, 1985
- 68) Herbison AE: Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Rev Reprod* 2:1–6, 1997
- 69) Haven RL, Meyer SL, Goodma RL: Separate neural systems mediate the steroid-dependent and steroid-independent suppression of tonic luteinizing hormone secretion in anestrus ewe. *Biol Reprod* 53:562–71,1986
- 70) Whisnant CS, Goodman RL: Dopaminergic structures in ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. *Endocrinology* 134:1905–14, 1994

- 71) Bennet-Wimbush K, Loch WE, Plata-Madrid H, Evans T: The effect of perphenazine and bromocriptine on follicular dynamics and endocrine profile in anestrus pony mares. *Theriogenology* 48:633–717, 1998
- 72) Besonet B, Hansen BS, Daels PF: Dopaminergic regulation of gonadotrophin secretion in seasonally anoestrous mares. *J Reprod Fertil* 108:55–61, 1996
- 73) Mattioli M, Seren E: Effect of bromocriptine treatment during lactational anestrus in the pig. In: Ellendorff F, Elasaesser F, editors. *Endocrine causes of seasonal and lactational anestrus in farm animals*. Martinus-Nijhoff 165–78, 1985
- 74) Bevers MM, Willemse MH, Kruip TAM: The effect bromocriptine on luteinizing hormone levels in the lactating sow: evidence for a suppressive action by prolactin and the suckling stimulus. *Acta Endocrinol* 104:261–5, 1983
- 75) Kraeling RR, Rampacek GB, Cox NM, Kiser TE: Prolactin and luteinizing hormone secretion after bromocriptine (CB 154) treatment in lactating sows and ovariectomized gilts. *J Anim Sci* 54:1212–20, 1982
- 76) De Rensis F, Quintavalla F, Foxcroft GR: Treatment of lactating sows with the dopamine agonist Cabergoline: effects on LH and prolactin secretion and responses to challenges with naloxone and morphine. *Animal Reprod Sci* 51:233–47, 1998
- 77) Beck W, Hancke JL, Wuttke W: Increased sensitivity of dopaminergic inhibition of luteinizing hormone release in immature and castrated female rats. *Endocrinology* 102:837–43, 1978
- 78) Lacau de Mengido I, Becu-Villalobos D, Libertun C: Sexual differences in the dopaminergic control of luteinizing hormone secretion in developing rat. *Dev Brain Res* 35:91–5, 1987
- 79) Picton HM, Tsonis GG, McNeilly AS: The antagonistic effect of exogenous LH pulses on FSH-stimulated preovulatory follicle growth in ewes chronically treated with a gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J Endocrinol* 127:273–83, 1990

- 80) Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, et al: A model for follicle selection and determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fert Dev* 5:459–78, 1993
- 81) Concannon PW: Biology of gonadotrophin secretion in adult and prepubertal female dogs. *J Reprod Fert* 49(Suppl): 3–27, 1993
- 82) Kooistra HS, Okkens AC: Secretion of prolactin and growth hormone in relation to ovarian activity in the dog. *Reprod Domest Anim* 36:115–29, 2001
- 83) Mori H, Arakawa S, Ohkawa T, Ohkawa R, Takada S, Morita T, et al: The involvement of dopamine in regulation of steroidogenesis in rat ovarian cells. *Horm Res* 41:36–40, 1994
- 84) King SS, Campbell AG, Dille EA, Roser JF, Murphy LL, Jones KL: Dopamine receptors in equine ovarian tissues. *Domest Anim Endocrinol* 28:405–15, 2005
- 85) Kann G, Denamur R. Possible role of prolactin during the estrous cycle and gestation in ewe. *J Reprod Fert* 39:473–83, 1974
- 86) Cahill L, Saumande J, Ravault MB, Blanc M, Thimonier J, Mariana JC, et al: Hormonal and follicular relationship in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fert* 62:141–50, 1981
- 87) Olson PN, Bowen RA, Behrendt MD, Olson JD, Nett TM: Concentrations of reproductive hormones in canine serum throughout late anestrus, proestrus and estrus. *Biol Reprod* 27:1196–206, 1982
- 88) Rota A, Mollo A, Marinelli L, Gabai G, Vincenti L: Evaluation of Cabergoline and Buserelin efficacy for oestrus induction in the bitch. *Reprod Domest Anim* 38:440–3, 2003
- 89) De Gier J, Kooistra HS, Djajadingrat-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens, AC: Temporal relation between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alfa-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* Apr 15: 65(7):1346-59. 2006

- 90) Okkens AC, Kooistra HS, Dieleman SJ, Bevers MM: Dopamine agonist effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches. *J Reprod Fert* 51(Suppl):55–8, 1997
- 91) Onclin K, Verstegen J, Silva LDM, Concannon P: Patterns of circulating prolactin, LH, and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dogs. *Biol Repr* 52:314–9, 1995
- 92) Beijerink NJ, Dieleman SJ, Kooistra HS, Okkens AC: Low doses of bromocriptine shorten the interestrous interval in the bitch without lowering plasma prolactin concentration. *Theriogenology* 60:1379–86, 2003
- 93) Kutzler MA: Induction and synchronization of estrus in dogs. *Theriogenology* 64:755–66, 2005
- 94) De Rensis F, Spattini G, Ballabio R, Scaramuzzi R,J: The effect of administering a dopamine agonist (Cabergoline) on follicular and luteal development during pro-estrus and estrus in the female greyhound. *Theriogenology* 66: 887-895, 2006
- 95) Schaefers-Okkens AC: Ovaries. *Clinical endocrinology of dogs and cats*. In: Rijnberk A, editor. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers: pp: 131–56, 1986
- 96) Concannon PW: Induction of fertile oestrus in anoestrous dogs by constant infusion of GnRH agonist. *J Reprod Fert* (Suppl) 39:149–60, 1998
- 97) De Gier J, Kooistra HS, Djajadiningrant-Laanen SC, Dieleman SJ, Okkens AC: Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch. *Theriogenology*; 66:1419–22, 2006
- 98) Concannon PW, Verstegen J: Estrus induction in dogs: user of gonadotrophin, therapies and dopamine agonist. *Proc Ann Meet Soc Theriogenol Montreal*: 245–7, 1997
- 99) Vaan Haaften B, Dieleman SJ, Okkens AC, Bevers MM, Willemsse AH: Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine. *J Reprod Fert* (Suppl): 39:330–1, 1989

- 100) Verstegen J, Onclin K, Silva L, Concannon P: Termination of obligate anestrus and induction of fertile ovarian cycles by administration of purified pig LH. *J Reprod Fertil*: 111: 35–40, 1997
- 101) Bouchard GF, Gross S, Ganjam VK, Youngquist RS, Concannon WW, Krause GF: Oestrus induction in the bitch with the synthetic oestrogens diethylstilboestrol. *J Reprod Fertil*: 47(Suppl): 515–6, 1993
- 102) Rains CP, Bryson HM, Fitton A: Cabergoline: a review of its pharmacological properties and therapeutic potential in the treatment of hyperprolactinaemia and inhibition of lactation. *Drugs*, 49:255–80, 1995
- 103) Spattini G, Borghi V, Thuròczy J, Baligh L, Scaramuzzi RJ, De Rensis F: Follicular development and plasma concentration of LH and prolactin in anestrus female dogs treated with the dopamine agonist cabergoline. *Theriogenology* 68:826-833, 2007
- 104) Downing JA, Joss J, Connell P, Scaramuzzi RJ: Ovulation rate and the concentrations of gonadotrophic and metabolic hormones in ewes fed lupin grain. *J Reprod Fertil*: 103:137–45, 1995
- 105) Kooistra HS, Okkens AC, Bevers MM, Popp-Snijders C, Van Haften B, Dieleman SJ, et al: Concurrent pulsatile secretion of luteinizing hormone during different phases of the oestrus cycle and anestrus in beagle bitches. *Biol Reprod*: 60:65–71, 1999
- 106) Gobello C, Bolognani F, de la Sota RL, Goya RG: Twenty-four-hour profile of serum prolactin and luteinizing hormone in anoestrous crossbred bitches. *Reprod Domest Anim*: 36:41–5, 2001
- 107) Corrada Y, Rimoldi I, Arreseigor S, Marecco G, Gobello C: Prolactin reference range and pulsatility in male dogs. *Theriogenology*: 66:1599–602, 2006
- 108) Koch A, Hoppen HO, Dieleman SJ, Kooistra HS, Gunzel-Apel AR: Effects of the dopamine agonist cabergoline on pulsatile and TRH-induced secretion of prolactin, LH, and testosterone in male beagle dogs. *Theriogenology*: 65:1666–77, 2006

- 109) Concannon P, Lasley B, Vanderlip S: LH release, induction of estrus and fertile ovulation in response to pulsatile administration of GnRH to anoestrous dogs. *J Reprod Fertil* 51 (Suppl):1–54, 1997
- 110) Inaba T, Tani H, Gonda M, Nakagawa A, Phumura M, Mori J: Induction of Fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate). *Theriogenology*: 49:975–82, 2005
- 111) Mayerhofer A, Hemmings HC, Gretchen LS, Greengard P, Boddien S, Berg U, et al: Functional dopamine D1 receptors and DARPP-32 are expressed in human ovary and granulosa luteal cells in vitro. *J Clin Endocrin Metab*: 84:257–64, 1999
- 112) Jeffcoate JA, Lindsay FEF: Ovulation detection and timing of insemination based on hormone concentrations, vaginal cytology and endoscopic appearance of the vagina in domestic bitches. *Journal of Reproduction and Fertility*: 39 (suppl): 277-287, 1989
- 113) Ellinwood WE, Nett TM, Niswender GD: Ovarian vasculature and function. In *The Vertebrate Ovary*. Ed. RE Jones. Plenum Press, New York: pp 583-614, 1978
- 114) Andersen AC, Simpson ME: Puberty- the first estrus cycle. In pregnant and non-pregnant beagle. In *The Ovary and Reproductive Cycle of the dog (Beagle)*. Eds. Geron-X inc. Los altos, California: pp 105-194, 1973
- 115) Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A: Local changes in blood flow within preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 125: 759-767, 2003
- 116) Brown BW, Emery MJ, Mattner PE: Ovarian arterial blood velocity measured with Doppler ultrasonic transducers in conscious ewes. *Journal of Reproduction and Fertility*: 58: 295-300, 1980
- 117) Koster K, Poulsen Nautrup C, Gunzel-Apel AR: A Doppler ultrasonographic study of cyclic changes of ovarian perfusion in the Beagle bitch. *Reproduction* 122(2): 453-461, 2001
- 118) Holst PA, Phemister RP: Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance. *American Journal of Veterinary Reserch* 35: 401-406, 1974

- 119) Klagsbrun M, D'Amore PA: Regulators of angiogenesis. *Annual Review of Physiology* 53:217-239, 1991
- 120) Deeg KH, Woerle K, Schonau E: Farbkodierte Dopplersonographie der Nierengefäße im Kindesalter. *Monatsschrift für Kinderheilkunde* 138: 256-267, 1990
- 121) Cavender JL, Murdoch WJ: Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicle. *Biology of Reproduction* 39: 989-997, 1988
- 122) Kurjak A, Kupesic S: Ovarian senescence and its significance on uterine and ovarian perfusion. *Fertility and Sterility* 64: 532-537, 1995