FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA

in collaborazione con l'ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA ITALIANA DI CONIGLICOLTURA

RIPRODUZIONE E BENESSERE IN CONIGLICOLTURA: RECENTI ACQUISIZIONI SCIENTIFICHE E TRASFERIBILITÀ IN CAMPO

Aggiornamento professionale per Medici Veterinari e Agronomi

13-14 Marzo 2003 - Facoltà di Agraria, Borgo XX Giugno, 74 - Perugia

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

55

RIPRODUZIONE E BENESSERE IN CONIGLICOLTURA: RECENTI ACQUISIZIONI SCIENTIFICHE E TRASFERIBILITÀ IN CAMPO

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e marketing
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni Alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del Suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1ª conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica
40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del Coniglio
44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955- 2000
48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
50 - 2002 Atti della giornata di studio in Cardiologia Veterinaria
51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE
55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE
ZOOTECNICHE - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA

in collaborazione con l'ASIC
ASSOCIAZIONE SCIENTIFICA ITALIANA DI CONIGLICOLTURA

RIPRODUZIONE E BENESSERE IN CONIGLICOLTURA: RECENTI ACQUISIZIONI SCIENTIFICHE E TRASFERIBILITÀ IN CAMPO

Aggiornamento professionale
per Medici Veterinari e Agronomi

13-14 Marzo 2003

Facoltà di Agraria, Borgo xx Giugno, 74 - Perugia

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via A. Bianchi, 1 - 25124 Brescia

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, Marzo 2004

Tipografia Camuna - Brescia 2004

PREMESSA

L'Istituto per la Qualificazione e l'Aggiornamento Tecnico Professionale in Agricoltura di Brescia, la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, il Dipartimento di Scienze Zootecniche dell'Università degli Studi di Perugia e l'Associazione Scientifica Italiana di Coniglicoltura (ASIC), organizzano a Perugia, nei giorni 13 e 14 marzo 2003, un Corso di Aggiornamento Professionale per Medici Veterinari, Dottori Agronomi e Zoonomi sul tema **Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo.**

L'attuale panorama produttivo della coniglicoltura intensiva italiana è strettamente legato all'applicazione della tecnica dell'inseminazione artificiale che, pur essendo conosciuta e praticata da circa 60 anni, ha assunto una grande importanza solo nell'ultimo decennio con la diffusione della gestione ciclizzata dell'allevamento.

Lo studio delle tecniche e dei fattori che influenzano l'efficienza riproduttiva sia del maschio che della femmina è in continua evoluzione anche perché un'attenzione via via crescente viene riservata alle condizioni di benessere e di salute degli animali che influenzano fortemente la produttività globale dell'allevamento. Inoltre le normative in corso di definizione e l'opinione pubblica sollecitano il mondo della ricerca a studiare sistemi di allevamento meno intensivi e quindi più rispettosi delle esigenze comportamentali degli animali. Tutto ciò si traduce nell'offerta di condizioni meno stressanti con tangibili vantaggi anche a livello di sistema immunitario degli animali.

I molteplici e fondamentali aspetti legati a questa nuova concezione degli allevamenti zootecnici giustificano il corso di aggiornamento programmato con il quale si cercherà di arricchire in senso teorico gli iscritti non trascurando gli aspetti applicativi, che verranno affrontati in apposite sessioni.

Brescia, 9 dicembre 2002

RELATORI

BESENFERDER URBAN
Research Institute Tulln, Department of Biotechnology in Animal Production, Tulln (Austria).

BOITI CRISTIANO
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie.

CASTELLINI CESARE
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Zootecniche.

COLLODEL GIULIA
Università degli Studi di Siena, Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione.

DAL BOSCO ALESSANDRO
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Zootecniche.

FIORETTI ALESSANDRO
Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale.

LATTAIOLI PAOLO
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Scienze Zootecniche.

LIGUORI LAVINIA
Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Biologia Molecolare - Sezione Biochimica Cellulare

MONACI MAURIZIO
Università degli Studi di Perugia, Dip. Patologia Diagnostica e Clinica Veterinaria – Sez. Ostetricia e Ginecologia.

SETTA BENIAMINO
Veterinario Gruppo Martini

THEAU-CLEMENT MICHÈLE
INRA, Castanet Tolousan Cedex (Francia)

TROCINO ANGELA
Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Produzioni Animali

XICCATO GEROLAMO
Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Produzioni Animali

INDICE

Cristiano Boiti
FISIOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE NELLA CONIGLIA FATTRICE:
MECCANISMI DI CONTROLLO DELLA FUNZIONALITÀ OVARICA 11

Alessandro Fioretti, Anna Cerrone
PATOLOGIE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE
ED EFFETTI SULLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE 41

Gerolamo Xiccato
PROBLEMATICHE LEGATE AL DEFICIT ENERGETICO NELLE CONIGLIE 55

Cesare Castellini
RITMI RIPRODUTTIVI E BENESSERE DELLA FATTRICE 63

Alessandro Dal Bosco, Angela Trocino
TECNICHE DI SVEZZAMENTO PRECOCE E BENESSERE DEI CONIGLIETTI 67

Urban Besenfelder
BIOLOGIE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE IN CONIGLICOLTURA:
MODERNE ACQUISIZIONI E ASPETTI PRATICI 75

Beniamino Setta
TECNICHE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE E PROBLEMATICHE DI CAMPO 79

Maurizio Monaci
FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DEL CONIGLIO MASCHIO 83

Michèle Theau-Clément
FATTORI DI PRODUTTIVITÀ LEGATI AL MASCHIO 89

Giulia Collodel
ANALISI ULTRA-MICROSCOPICA DEL SEME DI CONIGLIO 97

Lavinia Liguori, Ilaria Bellezza
METABOLISMO DELLO SPERMATOZOO DI CONIGLIO 101

Lattaioli Paolo
ANALISI MICROSCOPICHE DEL SEME DI CONIGLIO MEDIANTE CASA 105

FISIOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE NELLA CONIGLIA FATTRICE: MECCANISMI DI CONTROLLO DELLA FUNZIONALITÀ OVARICA

CRISTIANO BOITI

Dipartimento di Scienze Biopatologiche Veterinarie -Università di Perugia

Le ovaie, o gonadi femminili, sono gli organi sessuali primari ed insieme a quelli accessori (tube di Falloppio, utero, vagina e mammelle) costituiscono l'apparato genitale femminile. Le ovaie svolgono una duplice funzione: gametogenica (produzione e maturazione delle cellule germinali femminili, uova) ed endocrina (secrezione di ormoni sessuali steroidei, estrogeni, androgeni e progestinici, e non steroidei, inibina, relaxina, ossitocina ed altri).

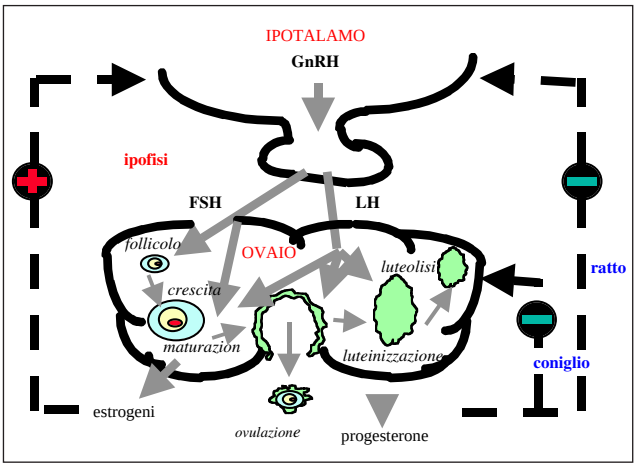


Figura 1. Schema dell'asse gonadico, maschile e femminile, e dei meccanismi di regolazione esercitati dal progesterone e dall'estradiolo. Il segno più indica azione positiva, il segno meno inibizione. A destra, sono meglio dettagliati i principali eventi ovarici che si verificano prima e dopo l'ovulazione.

L'attività delle ovaie, sia gametogenica che endocrina, è strettamente controllata dal sistema ipofisario tramite le gonadotropine (FSH, LH), a sua volta regolato dall'ipotalamo, tramite l'ormone GnRH (gonadoliberina). L'insieme di queste complesse interazioni che coinvolgono l'asse gonadico è riassunto nella Figura 1.

Allo stesso tempo, gli ormoni prodotti dalle ovaie agiscono sugli organi sessuali secondari, inducendo tutte quelle modificazioni necessarie affinché la cellula uovo raggiunga il suo massimo traguardo biologico, che consiste nell'unirsi con uno spermatozoo per produrre un embrione capace di svilupparsi sino alla nascita della prole. E' ovvio quindi che le ovaie hanno un ruolo centrale nella fertilità: esse sono direttamente e/o indirettamente coinvolte in una serie di processi che vanno dalla regolazione del ciclo estrale, all'ovulazione, dalla qualità del gamete al funzionamento del corpo luteo (CL) e alla qualità dell'embrione.

In questi ultimi anni, sono stati compiuti enormi progressi nel campo della biologia riproduttiva e dell'ovaio in particolare. Tuttavia, per esigenze di spazio, nell'ambito del controllo della funzionalità ovarica, mi soffermerò soprattutto sui meccanismi luteolitici della prostaglandina F2α (PGF2α) in grado di regolare la funzionalità dei CL nella coniglia e che sono

stati oggetto di studio da parte del nostro gruppo nel corso degli ultimi anni. Infatti, la PGF2α rappresenta uno dei fattori più importanti coinvolti nella regolazione dell'attività riproduttiva di numerose specie animali, tra cui anche il coniglio. In particolare, per quanto concerne il ruolo di questa prostaglandina nella luteolisi, le numerose ricerche hanno portato alla conclusione che la PGF2α può essere considerata il principale ormone luteolitico. Tuttavia, bisogna prestare attenzione nel non generalizzare, poiché gli effetti luteolitici della PGF2α, anche se comuni a diverse specie animali, avvengono probabilmente attraverso meccanismi molecolari non sempre comparabili e possono avere significati fisiologici diversi.

In alcune specie animali, la luteolisi è un evento che si verifica con cadenza ciclica, garantendo la ripresa dell'attività ovarica al termine di ogni ciclo estrale. La coniglia, al contrario, è un animale con caratteristiche riproduttive peculiari. Infatti, la sua attività ovarica non è caratterizzata da un'alternanza ciclica delle diverse fasi (estrali e diestrali) e, inoltre, l'ovulazione avviene solo se stimolata dall'accoppiamento (ovulazione indotta) o da trattamenti ormonali. Se all'ovulazione non si associa la fecondazione e la fertilizzazione, nella coniglia si instaura una fase "pseudogravidica", che si prolunga per un periodo di 15-18 giorni al termine dei quali si ha la regressione dei CL. Il ruolo dei fattori luteolitici nella coniglia è quindi di estrema importanza poiché, riducendo la lunghezza della pseudogravidanza, le conferisce una capacità riproduttiva molto elevata che le consente di riprodursi durante tutto l'arco dell'anno senza periodi di anestro.

Il ciclo estrale nella coniglia

Nei mammiferi, ad eccezione dei primati, l'ovulazione avviene ad intervalli regolari nel corso del periodo detto "estro". Sulla base della frequenza dei cicli estrali e della loro regolarità, gli animali sono classificati come *poliestrali, poliestrali stagionali e monoestrali*.

Per contro, il coniglio non mostra dei cicli estrali regolari nel corso dei quali l'ovulazione ha luogo spontaneamente. La coniglia è considerata come un animale in estro più o meno permanente in cui l'ovulazione si verifica solo in caso di accoppiamento. Questa specie rientra nel gruppo degli animali ad ovulazione "riflessa" o "indotta" per distinguerla da quelle cosiddette ad ovulazione spontanea (HAMMOND e MARSHALL, 1925; GALPERIN, 1937; ROBSON, 1947; BULLOUGH, 1951). Durante tale periodo i follicoli ovarici si sviluppano e regrediscono continuamente, cosicché il numero di quelli in fase preovulatoria è quasi costante. Se la coniglia non si accoppia i follicoli ovarici permangono di notevoli dimensioni (circa 1,2-1,5 mm di diametro) per 12-16 giorni, secondo alcuni autori, secondo altri per soli 7-10 giorni (SHIBATA, 1931; HILL e WHITE, 1933; BUTTNER e WIENERT, 1935).

Sviluppo follicolare e steroidogenesi

Lo sviluppo dei follicoli e l'attività dell'ovaio dipendono dagli ormoni ipofisari FSH e LH. Quando uno o più follicoli iniziano ad evolvere, essi continuano l'accrescimento sino all'ovulazione o all'atresia (degenerazione), evento che si verifica nella maggior parte dei follicoli che iniziano la fase maturativa. Il tempo totale richiesto dall'inizio dello sviluppo maturativo fino all'ovulazione non è noto con precisione nella coniglia. Lo sviluppo del follicolo (o dei follicoli) sino allo stadio di formazione dell'antro non è strettamente dipendente dalla presenza di gonadotropine com'è stato sperimentalmente dimostrato in animali ipofisectomizzati.

Pertanto, in questa prima fase si deve ipotizzare che la maturazione follicolare sia sotto il controllo di fattori intraovarici. Al contrario, la formazione del follicolo antrale ed il suo accrescimento finale sono direttamente dipendenti dall'azione degli ormoni FSH e LH (Figura 2). Il primo svolge un ruolo fondamentale nella formazione del follicolo antrale, stimolando la mitosi delle cellule della granulosa e la formazione del liquido follicolare. Inoltre, lo FSH incrementa il numero dei recettori per l'LH nelle cellule della granulosa, predisponendole al successivo processo di luteinizzazione che consegue l'ovulazione.

Viceversa, le cellule tecali sono stimolate dall'LH ed i recettori per questo ormone sono presenti sin dall'inizio della formazione delle cellule della teca. Il principale ormone steroideo prodotto dal follicolo è rappresentato dal 17-b estradiolo, ma nella coniglia sono prodotti anche progestinici ed androgeni; questi ultimi possono essere secreti in quantità superiori a quelle degli estrogeni. Esperimenti condotti *in vitro* hanno inequivocabilmente dimostrato che le cellule tecali del follicolo secernono soprattutto testosterone, mentre le cellule della granulosa convertono il testosterone in 17-b estradiolo grazie alla loro elevata attività aromatasica. Le cellule della granulosa producono e secernano 17-b estradiolo solo se nel mezzo di coltura viene aggiunto testosterone. L'aggiunta di FSH incrementa la secrezione di estradiolo. L'estradiolo è, inoltre, un importante fattore mitogeno in grado di stimolare la divisione delle cellule della granulosa (RICHARDS et al., 1987).

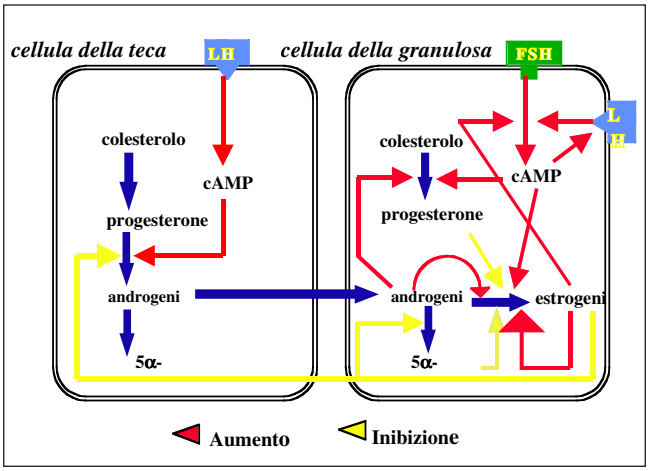


Figura 2. Principali sedi di regolazione della steroidogenesi follicolare nel ratto regolati dall'FSH e dall'LH secondo la teoria dei due compartimenti.

Ovulazione

Fin dal 1905, Heape dimostrò che nella coniglia l'ovulazione è indotta da stimoli associati al coito e che questa avviene tra la 10ª e la 12ª ora successiva (HILLIARD et al., 1964; SAGINOR e HORTON, 1968). Nella coniglia si parla pertanto di ovulazione riflessa neuro umorale e questa consta di due vie:

1. la via afferente (via nervosa), che trasmette gli stimoli provocati dal coito al sistema nervoso centrale (SNC) e,
2. la via efferente (via umorale) che invia i segnali del SNC alle ovaie per l'ovulazione.

Gli stimoli afferenti, in grado d'indurre l'ovulazione nella coniglia, non derivano solamente dal coito, ma anche da altre aree recettoriali e possono essere notevolmente influenzati, sia positivamente che negativamente, da molti fattori esterni di origine ambientale e/o sociale. E proprio su questa base che, recentemente, sono state proposte alcune tecniche in grado di aumentare la recettività sessuale delle coniglie in alternativa all'impiego di ormoni esogeni (THEAU-CLEMENT et al., 1998). L'ipotalamo libera modeste quantità di GnRH, che attraverso il circolo portale ipofisario agisce sull'ipofisi anteriore inducendo la liberazione degli ormoni FSH e LH entro pochi minuti dallo stimolo ovulatorio (Figura 1). L'ovulazione può essere indotta anche farmacologicamente, agendo direttamente sulla via efferente a livello ipofisario mediante la somministrazione di GnRH (ormone liberante le gonadotropine) o a livello ovarico mediante l'HCG (gonadotropina corionica umana d'origine placentare). Il ruolo dell'FSH nel riflesso ovulatorio non è ben definito, ma potrebbe rinforzare l'azione dell'LH. Entro due ore dall'accoppiamento si ha un picco di concentrazione di LH nel sangue. Il picco ovulatorio dell'LH attiva tutta una serie di processi che, nella coniglia, portano all'ovulazione tra la 10ª e la 12ª ora dal coito (o dalla somministrazione esogena di una dose ovulatoria di GnRH o HGC). Contemporaneamente, in relazione all'accoppiamento, l'ipotalamo induce la liberazione di ossitocina da parte dell'ipofisi posteriore.

In concomitanza con il picco di LH è stata descritta una liberazione di prostaglandine, localmente, a livello ovarico che potrebbero avere un ruolo nell'indurre la rottura del follicolo a livello dello stigma. Quattro, cinque ore dopo il coito, i livelli di LH ritornano sui valori basali, mentre si osserva un nuovo picco di FSH 16-22 ore dopo. Questa ulteriore secrezione di FSH permette di stimolare la formazione di una nuova popolazione di follicoli ovarici che si svilupperanno fino allo stadio antrale. Questi follicoli avranno una funzione luteotrofa fondamentale, mediata dall'17-β estradiolo, sui CL già a partire dalla quinta o sesta giornata dall'ovulazione.

Gravidanza e Pseudogravidanza

Nel coniglio la gestazione ha una durata di 30-33 giorni. La razza ha una certa incidenza sulla sua variabilità. Il mantenimento della gravidanza, durante tutto il periodo di gestazione, è garantito dal progesterone. Nel coniglio, l'unica fonte di progesterone è il corpo luteo. La durata dell'attività steroidogenica del CL, si mantiene approssimativamente per 30-32 giorni, durante i quali assicura la sintesi del progesterone necessario al mantenimento della gravidanza (Figura 3).

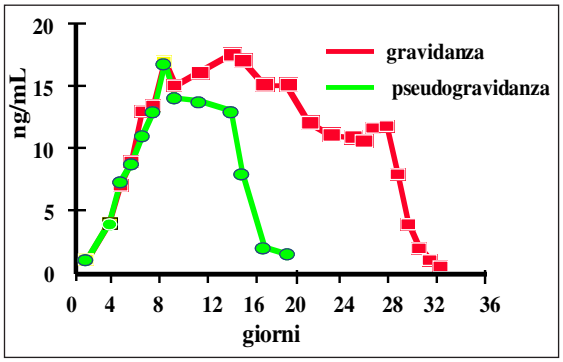


Figura 3. Progesteronemia in coniglie dutante la gravidanza e la pseudogravidanza (Da Gadsby, 1989).

Se all'ovulazione non è associata la fertilizzazione, nelle coniglie s'instaura una pseudogravidanza, con un blocco dell'attività riproduttiva per 15-18 giorni, poiché i CL che si formano in seguito all'ovulazione persistono e continuano a sintetizzare e rilasciare progesterone, e regrediscono solamente verso il 17-18° giorno (Figura 3).

IL CORPO LUTEO

Cenni storici

Il corpo luteo (CL) è una ghiandola endocrina ad attività transitoria, molto importante per la regolazione di un normale ciclo riproduttivo e per il mantenimento della gravidanza. Il primo ad osservarne la presenza dandone un'accurata descrizione, fu Regnier de Graaf (1641-1673) mentre conduceva uno studio sulla riproduzione delle coniglie. Immediatamente dopo il coito osservò la formazione di una struttura sferoidale sull'ovaio, che persisteva fino al momento del parto e il cui numero era in stretta relazione con quello dei nascituri. Il nome di corpo luteo, tuttavia, in latino significa "corpo giallo", fu coniato per la prima volta da Marcello Malpighi (MALPIGHI, 1689). Successivamente, Frenkel, nel 1903, dimostrò l'importanza del CL nel mantenimento della gravidanza, studiando gli effetti della loro enucleazione dall'ovaio di coniglie gravide (FRAENKEL, 1903). Vent'anni dopo, nel 1929, Allen e Corner (CORNER e ALLEN, 1929; ALLEN e CORNER, 1930), dimostrarono che, utilizzando un estratto lipidico ottenuto dal CL, era possibile mantenere la gravidanza in coniglie ovariectomizzate. Il principio attivo contenuto nell'estratto lipidico fu successivamente isolato in laboratorio e chiamato progesterone, nel 1934.

Sviluppo e struttura del corpo luteo

Benché le modalità attraverso le quali il CL è in grado di svolgere le sue funzioni siano molto simili fra le diverse specie di mammiferi, i meccanismi che regolano la crescita e la regressione del CL variano in relazione alla specie considerata.
Il CL si forma subito dopo l'ovulazione; le cellule luteali che lo costituiscono prendono origine dalle cellule della parete del follicolo di Graaf, che residuano. La sua formazione avviene in seguito ad una serie di cambiamenti morfologici e biochimici, che si hanno nelle cellule della teca interna e della granulosa di tale follicolo. Questi cambiamenti, definiti con il termine di luteinizzazione, sono il risultato di un notevole aumento dei livelli serici di LH. Quindi, sotto l'influenza del picco preovulatorio dell'LH, secreto dall'ipofisi anteriore, avviene lo scoppio e l'espulsione dell'ovulo. La parete del follicolo collassa nella cavità formatasi, che sarà contemporaneamente invasa dai capillari provenienti dalla teca interna. Lo sviluppo della nuova rete di capillari sembra essere dovuta all'intervento di fattori angiogenici secreti immediatamente dopo l'ovulazione. Il picco preovulatorio di LH induce l'ovulazione e contemporaneamente la differenziazione delle cellule follicolari in luteiniche determinando, quindi, l'inizio della sintesi del progesterone. Da questo momento in poi, il progesterone sarà il principale ormone steroideo prodotto da tali tipi di cellule.

I cambiamenti biochimici, morfologici strutturali e ultrastrutturali che avvengono nelle cellule del follicolo post ovulatorio, portano alla formazione delle cellule luteali, distinte istologicamente in "grandi" e "piccole". In accordo con la teoria dell'esistenza di due diver-

si tipi di cellule, le “piccole” cellule luteali (SLC, small luteal cells) derivano dalle cellule della teca interna, mentre le grandi (LLC, large luteal cells) dalle cellule della granulosa (NISWENDER et al., 1994). Dal punto di vista biochimico, entrambi i due tipi sono in grado di secernere il progesterone, ma morfologicamente si distinguono nettamente. Le LLC rappresentano le più grandi cellule endocrine del corpo, il loro diametro può raggiungere i 40 micron e più nella donna (ENDERS, 1973), sono presenti, inoltre, nel loro citoplasma numerosi granuli di secrezione rilasciati mediante esocitosi. Al contrario le SLC, non contengono tali granuli e hanno un diametro non superiore ai 20 micron. Nel coniglio, HOYER et al. (1986) studiarono l’istologia del CL e i cambiamenti del numero e delle dimensioni delle cellule luteali, utilizzando cellule isolate mediante digestione enzimatica, nel corso della pseudogravidanza. Anche se, le osservazioni condotte attraverso lo studio delle cellule luteiniche di coniglio, non sempre consentono con certezza di esprimere un giudizio riguardo alla presenza di due tipi di cellule nel CL del coniglio, tale teoria è stata anche in questa specie accolta, pur rimanendo alcuni dubbi. Le SLC sintetizzano bassi livelli di progesterone ma rispondono all’LH aumentandone il suo rilascio; al contrario le LLC producono elevate quantità di progesterone, ma non rispondono alla stimolazione mediante LH (HOYER et al., 1986).

In aggiunta alle cellule steroidogeniche, il CL è costituito da cellule endoteliali, fibroblasti, macrofagi, linfociti (CHANNING, 1969). Tali cellule “non luteali”, non hanno attività steroidogenica ma svolgono funzioni importanti nel regolare lo sviluppo e la regressione del CL (Del VECCHIO, 1997).

Le luteotropine

Con il termine di luteotropina, s’intendono tutte quelle sostanze in grado di promuovere la crescita del CL e di stimolare la produzione di progesterone. Esistono diversi meccanismi in tutte le cellule del CL che controllano lo sviluppo e la funzionalità del corpo luteo stesso e, quindi, anche la sintesi e la secrezione del progesterone, interagendo con i segnali prodotti localmente e/o che vi giungono attraverso la via sistemica. Tuttavia, ci sono considerevoli differenze tra le specie riguardo ai meccanismi insiti nello sviluppo e regolazione del CL che complicano la comprensione del processo di luteinizzazione.

Anche nel coniglio, come in altre specie, l’LH interviene nella regolazione dell’attività funzionale del CL. Sulla superficie delle cellule luteali isolate da CL di coniglio sono stati identificati, infatti, i recettori per l’LH associato, tramite proteine G regolatrici, al sistema enzimatico della proteina chinasi A (PKA) AMP ciclico-dipendente. Nonostante ciò, l’importanza dell’LH, quale fattore luteotropo in questa specie animale, è ancora da approfondire (MCLEAN et al., 1987).

Invece, il principale fattore luteotropico nel coniglio è considerato il 17-β estradiolo, dal quale i CL sono completamente dipendenti (MCLEAN e MILLER, 1985). Negli studi condotti *in vivo* sulla coniglia durante la fase pseudogravidica, infatti, si è osservato che somministrando tale estrogeno si determina un aumento della durata della pseudogravidanza e dell’attività luteale (BILL e KEYES, 1983), piuttosto che una sua riduzione come si verifica nelle altre specie animali. Per quanto concerne l’origine del 17-β estradiolo, fino a poco tempo fa si riteneva che nel coniglio fossero solo i follicoli ovarici il luogo di sintesi e di secrezione e non i CL, giacché questi sembravano essere sprovvisti di attività aromatasica. In realtà, studi successivi, condotti da ARIQUA et al. (1997), hanno dimostrato che il tessuto luteale del coniglio, se iperstimolato, possiede una certa attività aromatasica, anche se modesta, ed è quindi in grado di produrre 17-β estradiolo. I meccanismi d’azione del 17-β estradiolo che spiegano la sua capacità luteotropa non sono stati del tutto chiariti. La sua assenza comporta probabilmente un effetto negativo sulla sintesi e secrezione del progeste-

rone luteale. In tale ambito, l'azione dell'LH sembrerebbe quella di stimolare le cellule dei follicoli a produrre estradiolo, confermando il suo ruolo secondario nel mantenimento dell'attività dei CL nella coniglia (HOLT, 1989). Un'altra chiave di lettura per spiegare l'attività luteotropa degli estrogeni in questa specie, potrebbe essere data ipotizzando una loro azione protettiva nei confronti della PGF2a sui corpi lutei (GUTKNECHT, DUNCAN e WYNGARDEN, 1972). Gli estrogeni potrebbe indurre un cambiamento della secrezione di PGF2a uterina da endocrina ad esocrina, così com'è stato proposto nel suino (MOELJONO et al., 1976; MOELJONO et al., 1977).

Tuttavia, grazie allo sviluppo e all'applicazione di tecniche sperimentali più raffinate, è stato possibile definire meglio la regolazione di tutta l'attività ovarica, compresa quella luteale. Gli esperimenti condotti *in vitro* su cellule luteali isolate hanno permesso di evidenziare l'elevata complessità di tale meccanismo di regolazione e hanno evidenziato gli effetti biologici che alcune sostanze di origine non steroidea hanno su queste cellule.

Nel gruppo delle luteotropine sono stati inclusi, quindi, altri fattori che, in confronto ai classici ormoni considerati "macroregolatori", agiscono localmente e sono prodotti in minuscole quantità. Tali fattori raggiungono le loro cellule bersaglio senza passare attraverso il circolo sistemico, ma sono simili agli ormoni, intesi in senso "classico", nella loro struttura, nell'interazione con le cellule bersaglio, e nelle azioni biologiche che sviluppano. È quindi fondamentale considerare, oltre al sistema endocrino "classico" di regolazione, anche il sistema paracrino e autocrino. In base a quest'ultima considerazione, con il termine di luteotropina si comprende un vasto gruppo di sostanze, in molti casi chimicamente diverse tra loro, che permettono di chiarire meglio la complessità dei meccanismi della regolazione intraluteinica.

L'elenco dei fattori che intervengono nella regolazione dell'attività ovarica, sia *in vivo* sia *in vitro,* cresce rapidamente. Particolare attenzione va posta su quei fattori di crescita mitogeni e angiogenici responsabili delle modificazioni cellulari e soprattutto della proliferazione cellulare e quindi dello sviluppo e accrescimento del o dei CL:

1. fattore di attivazione delle piastrine (PAF) (KHACHIGIAN, 1996),
2. fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) (GOSPODAROWICZ et al., 1985; NEUFELD et al., 1987),
3. insulin like factor 1 (IGF-1) (SUH et al., 1992; JUENGEL et al., 1997),
4. fattore di produzione eparinico (GRAZUL-BILSKA et al., 1992),
5. fattore di crescita vascolare ed endoteliale (VEGF) (REDMER et al., 1996).

Fattore di crescita vascolare ed endoteliale

L'attività angiogenica ovarica fu per la prima volta dimostrata nel CL di bovino (JACOB et al., 1977), e successivamente riscontrata in altri animali, compreso il coniglio (GOSPODAROWICZ et al., 1978). L'LH stimola, probabilmente, l'espressione dell'RNAm che codifica tale fattore, in particolar modo a livello delle cellule della granulosa (GARRIDO et al 1993; KOOS, 1995). Il fattore di crescita vascolare ed endoteliale, (VEGF) è molto importante per il CL, poiché garantisce la proliferazione delle cellule endoteliali necessaria allo sviluppo del CL e la formazione di una estesa rete capillare che supera quella di qualsiasi altro tessuto (REDMER e REYNOLDS, 1996; REYNOLDS, KILLILEA e REDMER, 1992). Infatti, il lume capillare rappresenta il 22% del volume totale del CL (DHARMARAJAN et al., 1985), e la maggior parte delle cellule che costituiscono il CL, sono direttamente adiacenti ai capillari o in prossimità di questi. Questa stretta interdipendenza delle cellule luteali nei confronti dei capillari garantisce un adeguato fabbisogno metabolico del CL, essendo il suo consumo di ossigeno per unità di peso maggiore di due-sei volte rispetto a quello di altri importanti organi come fegato, reni, e cuore (SWANN e BRUCE, 1987).

I neurotrasmettitori

Recenti studi sul tessuto ovarico di ratto, hanno permesso di dimostrare che tale tessuto ha la capacità di sintetizzare la nor-adrenalina (NE) dalla tiroxina, suo precursore (BAHR et al., 1985) e di secernerla (WOLF et al., 1986; FERRUZ et al., 1991; FERRUZ et al., 1992). Per questi ed altri motivi, le catecolamine sono state incluse nel gruppo dei fattori locali che regolano l'attività ovarica. Sembra probabile che le catecolamine di origine ovarica modulino la crescita follicolare e la sensibilità del follicolo alle gonadotropine, ma la precisa natura delle loro azioni rimane ancora oscura. Alcuni studi compiuti sul coniglio dimostrano l'azione luteotropa di tali sostanze (HUNZICKER-DUNN, 1982; HUNZICKER-DUNN et al., 1979); la nor-adrenalina, in particolare stimola la sintesi degli androgeni nelle cellule della teca interna (HERNANDEZ et al., 1988). Inoltre, è stato dimostrato che le catecolamine, hanno la capacità di attivare l'adenilato ciclasi nelle cellule luteali. Studi compiuti sulla scrofa (BIRNBAUMER et al., 1976), sul ratto (RANI et al., 1983) e anche sulla coniglia (HUNZICKER-DUNN et al., 1982; HUNZICKER-DUNN et al., 1979) concordano con il fatto che il tessuto follicolare sia relativamente insensibile alle catecolamine, mentre il CL o le sue cellule rispondono rapidamente con un aumento dell'attività dell'adenilato ciclasi. In particolare, la nor-adrenalina stimola la sintesi degli androgeni, da parte delle cellule interstiziali della teca (HERNANDEZ et al., 1988). Nel coniglio le catecolamine stimolano anche la secrezione del progesterone da parte dei CL (ABRAMOWITZ et al., 1982; HUNZICKER-DUNN et al., 1982; SOSA et al., 1980; DAY et al., 1980). Tale azione è attribuita, in parte, all'effetto inibitorio delle catecolamine sull'attività dell'enzima 20a-OH-steroido-deidrogenasi (SDH) (JONES et al., 1981), e, in parte, all'aumento della produzione di pregnenolone e alla stimolazione dell'attività della 3b-SDH (JONES et al., 1983).

La PGE_2

Un altro fattore luteotropico da prendere ancora in considerazione appartiene alla famiglia delle prostaglandine nella quale sono comprese, oltre alla PGF2α ad azione prettamente luteolitica, anche la PGE_2 che invece possiede attività luteotropa. L'azione della PGE_2 si esplica nella protezione del CL durante le prime fasi della gravidanza, quando la secrezione del progesterone è indispensabile per garantire l'impianto e il mantenimento della gravidanza, in diverse specie di mammiferi. Ad esempio, nel maiale la somministrazione della PGE_2 prolunga l'attività del CL e previene la luteolisi indotta dalla PGF2a (AKINLOSOTU et al., 1988).

L'azione della PGE_2 sembra esplicarsi attraverso un antagonismo o una prevenzione degli effetti indotti dalla PGF2α. Infatti, nella pecora, la somministrazione contemporanea di PGF2α e di PGE_2, previene la diminuzione della sintesi del progesterone rispetto a ciò che avviene negli animali trattati solamente con PGF2α (HENDERSON et al., 1977). Così, gli effetti citotossici della PGF2α sono completamente assenti se nelle colture di cellule luteali ovine, è usata contemporaneamente PGE_2 (SILVIA et al., 1984). Nelle coniglie in gravidanza, la PGE_2 è prodotta sia dall'endometrio sia dallo zigote (HARPER et al., 1983), ma in questa specie l'attività biologica della PGE_2 non è stata studiata approfonditamente come quella della PGF2α.

Attivita steroidogenica del CL: Il progesterone

L'attività steroidogenica del CL è indirizzata soprattutto alla sintesi e alla secrezione del progesterone, anche se il tessuto luteale mantiene, in parte, la capacità di sintetizzare altri

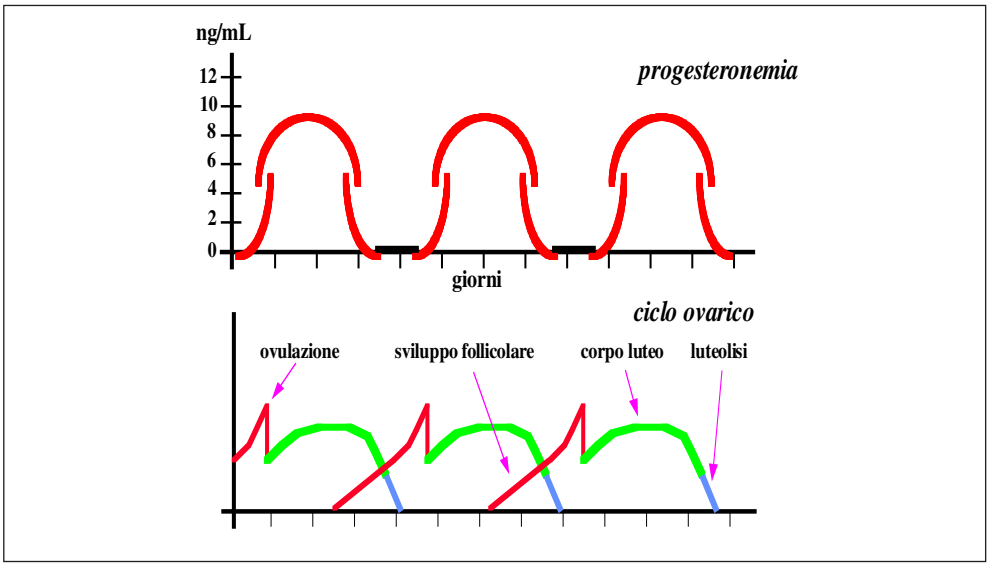


Figura 4. Esempio schematico del profilo del progesterone in relazione al ciclo ovarico in un modello animale poliestrale ad ovulazione spontanea

ormoni steroidei. Il ruolo svolto dal progesterone è di fondamentale importanza per il mantenimento della gestazione in diverse specie animali tra cui la coniglia, ed in sinergia con gli estrogeni controlla ogni minimo aspetto delle diverse funzioni riproduttive.

Mentre in un animale poliestrale ad ovulazione spontanea il progesterone presenta nel corso del postparto un andamento ciclico perfettamente sincrono con le fasi luteiniche del ciclo estrale che si alternano ad ogni ovulazione (figura 4), al contrario, nella coniglia, che è sì un animale poliestrale ma ad ovulazione indotta, le concentrazioni del progesterone permangono costantemente su valori basali indipendentemente dal susseguirsi delle fasi ovariche di ciascun ciclo estrale (figura 5).

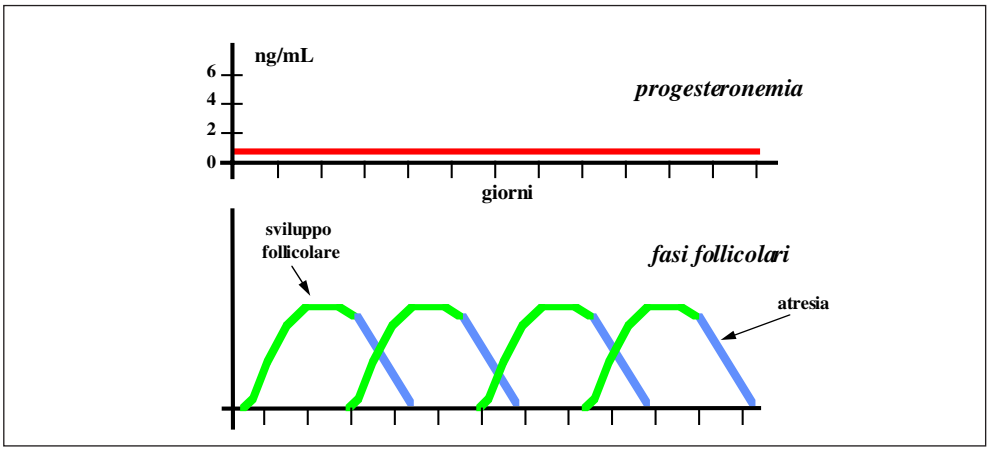


Figura 5. Esempio schematico del profilo del progesterone in relazione alle fasi ovariche nella coniglia.

Solamente nel caso di accoppiamento o di trattamento con GnRH o con gonadotropine (hCG, LH), in conseguenza dell'ovulazione così provocata, il progesterone presenta un rapido innalzamento che permane per un periodo variabile a seconda che la coniglia rimanga gravida o meno come già evidenziato nella figura 3.

Per la sua sintesi, il substrato necessario è il colesterolo prodotto dal fegato e trasportato alle cellule del tessuto luteinico attraverso il circolo sistemico legato alle lipoproteine, LDL e HDL. I recettori per queste lipoproteine sono presenti sulla superficie delle cellule luteali steroidogeniche (Figura 6). Una volta avvenuto il legame con questi recettori, le lipoproteine sono trasportate nella cellula mediante endocitosi e aggredite dai lisosomi il cui contenuto enzimatico consente la formazione di colesterolo libero nel citosol. In questo modo il colesterolo potrà essere utilizzato secondo le necessità della cellula, sia per la steroidogenesi sia per la formazione della membrana citoplasmatica, oppure potrà essere esterificato e quindi immagazzinato al suo interno. In qualsiasi momento, queste "scorte" cellulari di colesterolo potranno essere riutilizzate, grazie all'azione della colesterolo esterasi PKA-dipendente. La successiva tappa nella sintesi del progesterone prevede la conversione del colesterolo in pregnenolone, che avviene all'interno dei mitocondri. Il trasporto del colesterolo dall'esterno della membrana mitocondriale al suo interno, rappresenta un aspetto importante nella regolazione della steroidogenesi (STEVENS et al., 1993). Nel coniglio non sono stati compiuti ancora studi approfonditi che ci consentano di formulare ipotesi relative a tale aspetto, anche se è verosimile che i meccanismi siano fondamentalmente gli stessi. Per questo motivo, si dovrà fare riferimento agli studi che invece sono stati compiuti su altre specie animali, e che hanno permesso di adottare un modello sperimentale la cui validità nel coniglio deve essere ancora accertata.

Probabilmente il trasporto del colesterolo attraverso la membrana mitocondriale avviene per mezzo di alcune proteine denominate StAR (steroidogenic acute regulatory protein) (WATERMAN, 1995; ARAKANE et al., 1996; WANG et al., 1998; LIN et al., 1995), la cui sintesi sembrerebbe essere influenzata dall'LH ed anche dal GH (JUENGEL et al., 1995). Quindi, il colesterolo libero nella matrice mitocondriale viene trasformato in pregnenolone

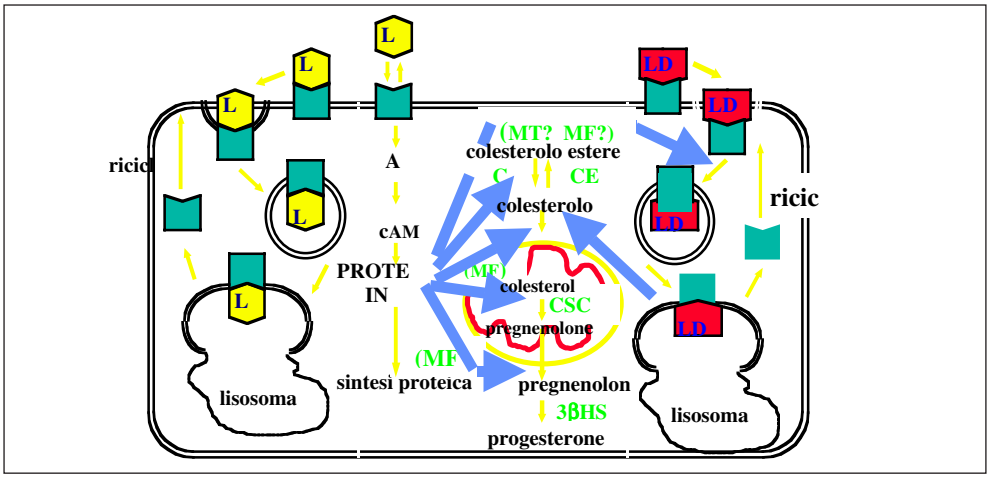


Figura 6. Rappresentazione schematica degli eventi implicati nella steroidogenesi LH dipendente. In azzurro sulla sinistra i recettori per l'LH; a destra i recettori per le LDL. AC (adenilato ciclasi), MT e MF rispettivamente microtubuli e microfilamenti, CE (colesterolo esterasi).

dal complesso enzimatico P-450 (STONE et al., 1954), e trasportato al reticolo endoplasmatico liscio, che generalmente è strettamente associato ai mitocondri. Qui il pregnenolone è convertito in progesterone dalla 3β-OH-steroidodeidrogenasi (3β-HSD) (HANUKOGLU, 1992). A questo punto, il progesterone sintetizzato dalle cellule luteiniche non può essere immagazzinato in elevate quantità e viene secreto mediante semplice diffusione.

Altri ormoni prodotti dal CL

Il CL sintetizza e libera altri ormoni anche in considerevoli quantità, anche se il tipo di ormoni secreto dipende dalla specie animale e dallo stadio riproduttivo. Ad esempio, il CL dei primati è in grado di sintetizzare l'estradiolo e la relaxina (WEISS, 1981), che può essere prodotta anche dal CL della scrofa (SHERWOOD et al., 1974) e del ratto (GOLDSMITH et al., 1982). Inoltre, in numerose specie animali, il CL contiene ossitocina (WATHES et al., 1982; SAWYER et al., 1986). Nella coniglia, però, la concentrazione di ossitocina nel CL è calcolata in ng per g di tessuto piuttosto che in μg/g come è stato riscontrato in altri animali, compresi i primati (WATHES, 1984; WATHES, 1989).

LA LUTEOLISI

Con il termine di "luteolisi" s'intende il processo che determina la regressione ciclica del CL. Il CL è, infatti, com'è già stato precedentemente menzionato, un organo particolare giacché è caratterizzato da un'attività transitoria. La sua attività funzionale, generalmente, si mantiene per un periodo di 10-14 giorni, in relazione alla specie animale, e quindi, degenera fino a formare il "corpo albicans", costituito da tessuto connettivo e collageno.

Durante la luteolisi è possibile distinguere due fasi, definite con i termini "funzionale" e "strutturale". La luteolisi "funzionale" implica una riduzione della capacità secernente del CL associata ad una diminuzione della concentrazione ematica di progesterone. Per convenzione, la luteolisi funzionale inizia quando la concentrazione del progesterone scende del 50% rispetto ai valori che si riscontrano nel picco della fase luteinica. La luteolisi funzionale si conclude quando la concentrazione plasmatica di progesterone scende al di sotto dei livelli tipici della fase estrale (KEHL e CARLSON, 1981). Nel coniglio, tale valore è usualmente inferiore ad 1 ng/ml. Con il termine luteolisi "strutturale" s'intende la involuzione della struttura del CL fino al corpo albicans. In realtà, non è sempre possibile separare nettamente i due eventi, essendo la luteolisi un processo continuo che implica contemporaneamente cambiamenti funzionali e strutturali.

Coinvolgimento dell'utero nella luteolisi e Identificazione della PGF2α come fattore uterino responsabile della luteolisi

L'importanza dell'utero nel controllo della regressione luteale, fu per la prima volta suggerita da Loeb nel 1923 (LOEB 1923; LOEB 1927), studiando gli effetti dell'isterectomia sulla cavia. L'isterectomia determina in diverse specie animali, compreso il coniglio, la persistenza del CL per un tempo maggiore (ANDERSON et al., 1969).

Nel coniglio, l'isterectomia, pur impedendo che s'instauri il processo luteolitico nei tempi usuali, determina il mantenimento di un'attività luteale a livelli inferiori rispetto a quelli

che si osservano durante la normale fase luteinica (STRABENFELDT et al., 1974; SQUIRES et al., 1975; MILLER et al., 1976; LYTTON et al., 1982).

Anche se il ruolo dell'utero nella luteolisi era noto da tempo, solamente nel 1964 è stato possibile individuare nella PGF2α la **"**luteolisina**"** responsabile della regressione ciclica del CL (EGLINTON et al., 1963; PICKLES, 1967). Tale concetto fu esteso a diverse specie domestiche, compreso il coniglio, e venne successivamente confermato con la somministrazione di indometacina, un inibitore della ciclossigenasi, un enzima necessario per la biosintesi della PGF2α (O'GRADY et al., 1972) o con la somministrazione di anticorpi anti PGF2α, che neutralizzando la sua azione, inibiva la luteolisi (O'GRADY et al., 1972; CALDWELL et al., 1972).

In tutti gli animali, con l'eccezione dei primati e della donna, la regressione spontanea del CL avviene approssimativamente, verso il 14°-16°giorno del ciclo estrale grazie all'azione della PGF2α di origine uterina. La somministrazione esogena di PGF2a è utilizzata per determinare la regressione del CL e permettere il controllo del ciclo ovarico.

Nella coniglia. durante la pseudogravidanza, i livelli plasmatici di progesterone iniziano a scendere, approssimativamente 12-14 giorni dopo l'ovulazione (SCOTT e RENNIE, 1970; HILLIARD et al., 1974; BROWNING et al., 1980). In questo periodo, il declino iniziale dell'attività funzionale del CL probabilmente non dipende dall'utero, giacché è stato evidenziato che i livelli di progesterone calano anche nei soggetti isterectomizzati. La luteolisi funzionale completa si osserva intorno al 16-18° giorno di pseudogravidanza e avviene esclusivamente nei soggetti intatti, ed è associata ad un aumento della concentrazione venosa di PGF2α (LYTTON e POYSER, 1982). Al contrario, non si hanno precise indicazioni circa la relazione tra il rilascio della PGF2α e l'iniziale regressione del CL intorno al 12-14 ° giorno di pseudogravidanza (LYTTON e POYSET, 1982). Esiste, in realtà, l'ipotesi che in questa specie, il fattore luteolitico sistemico sia un metabolita della PGF2α, il 13-14 diidro-PGF2α, che ha un'attività luteolitica quattro volte maggiore rispetto alla PGF2α (KEHL e CARLSON, 1981).

Azione locale e sistemica della PGF2α

In diverse specie di mammiferi, la PGF2α svolge la sua attività luteolitica agendo localmente e direttamente sul CL. Il meccanismo attraverso il quale ciò avverrebbe, però, non è stato ancora completamente chiarito, ed inoltre non è valido per tutte le specie animali. In alcune, sembra evidente che la PGF2α, sintetizzata e secreta dall'endometrio, sia immessa nel circolo sistemico attraverso il quale giungerebbe al CL.

L'azione diretta della PGF2α sul CL fu per la prima volta spiegata ipotizzando l'esistenza di una stretta connessione anatomica tra vena uterina e arteria ovarica, che permetteva alla PGF2α reflua dall'utero di raggiungere l'ovaio by passando il circolo sistemico (PIPER et al., 1970). In animali quali la pecora (INSKEEP et al., 1966; BUTCHER et al., 1969), la bovina (GINTHER et al., 1967), e la scrofa (du MESNIL 1961), lo studio degli effetti indotti sul CL in seguito ad isterectomia unilaterale confermerebbe quest'ipotesi. Infatti, in queste specie la regressione luteale si verifica nel corno uterino intatto, mentre nell'ovaia controlaterale il CL persiste.

Viceversa, è importante notare che nel coniglio, come nel cavallo, non vi è alcun elemento che possa far pensare all'esistenza di un effetto diretto della PGF2α sui CL (HUNTER et al., 1967), mentre è più probabile che gli effetti luteolitici siano esplicati attraverso la via sistemica. L'ipotesi della via sistemica è avvalorata dalla mancanza di basi anatomiche tali da permettere l'esistenza di un meccanismo a contro corrente tra la vena uterina e l'arteria ovarica (DEL CAMPO et al., 1972). In particolare, sono gli esperimenti fatti su coniglie

isterectomizzate che dimostrano l'importanza del passaggio nel circolo sistemico della PGF2a in questa specie animale. Infatti, nei soggetti sottoposti ad isterectomia unilaterale, si osserva la luteolisi dei CL presenti su entrambe le ovaie (HUNTER e CASIDA, 1967). Va tuttavia segnalato che l'immissione della PGF2a di origine uterina nel circolo sistemico comporta una sua drastica rimozione dal sangue soprattutto dopo il passaggio attraverso il circolo polmonare (PIPER et al., 1970).

Per quanto concerne l'azione locale della PGF2α, è stato dimostrato che il CL di diverse specie animali, compresi i roditori (OLOFSSON J. et al., 1992), è in grado di sintetizzare la PGF2α. E' probabile, pertanto, che la PGF2α prodotta localmente agisca attraverso meccanismi autocrini e paracrini nell'indurre la luteolisi (AULETTA et al., 1988), ma nel coniglio non ci sono dati che avvalorano tali ipotesi (GOBETTI et al 1999).

La luteolisi funzionale

Con il termine luteolisi funzionale si indica la diminuzione della capacità di sintetizzare e di secernere progesterone, da parte del CL.

Nel coniglio ed in altre specie animali, la somministrazione esogena di PGF2α, o i suoi analoghi, determinano un effetto luteolitico che si traduce in una rapida diminuzione della produzione del progesterone che è, però, relazionata all'età del CL (MARCINKIEWICZ et al., 1992; BOITI et al., 1998). La diminuita produzione e secrezione di progesterone sono probabilmente da imputare alla riduzione del flusso ematico e alla perdita della capacità steroidogenetica d'ogni singola cellula luteinica. Tuttavia, diverse altre ipotesi sono state avanzate per spiegare la diminuzione della sintesi del progesterone, e la regressione ciclica del CL indotta dalla PGF2α:

1. inibizione dei recettori per l'LH;
2. disaccoppiamento del legame tra i recettori per l'LH e l'adenilato ciclasi;
3. attivazione della protein chinasi C;
4. aumento della concentrazione intracellulare di Ca^{2+};
5. effetti citotossici.

Benché, ognuna di queste ipotesi è possibile, gli effetti della PGF2α appaiono diversi da specie a specie, e le azioni dimostrabili *in vivo* spesso si differenziano da quelle che si osservano *in vitro*.

Studio degli effetti della PGF2α in *vivo* nella coniglia

Durante lo studio degli effetti della PGF2α in *vivo* nella coniglia, è molto importante considerare lo stato riproduttivo del soggetto, poiché questo influisce direttamente sulla risposta luteolitica alla PGF2α. Infatti, la somministrazione di PGF2α al 7°giorno di pseudogravidanza non determina regressione del CL, mentre diventa pienamente luteolitica nelle coniglie al 7° giorno di gravidanza (MARCINKIEWICZ et al., 1992). Nelle coniglie pseudogravide, gli effetti luteolitici della PGFα dipendono dall'età del CL. Inoltre gli effetti luteolitici sono variabili e dipendono anche dalla dose ormonale utilizzata, dal protocollo adottato, e dal tipo di prostaglandina (naturale o sintetica) iniettato. Il CL diviene sensibile all'azione della luteolisina PGF2α dopo alcuni giorni dall'ovulazione la cui durata varia in relazione alla specie in esame. Ad esempio, nella pecora e nella bovina la refrattarietà del CL alla PGF2α si prolunga per 4-5 giorni dopo l'ovulazione, mentre nel ratto e nella scrofa tale periodo può protrarsi anche per 10 o più giorni (BEHRMAN et al., 1974). Al contrario,

la maggior parte degli studi fin qui condotti, miranti alla verifica degli effetti luteolitici della PGF2α nel coniglio sono stati effettuati *in vivo* su animali al 9° giorno di pseudogravidanza e utilizzando PGF2α naturale, mentre l'azione luteolitica dei suoi analoghi sintetici è stata studiata soltanto dall'11° giorno di pseudogravidanza (REBOLLAR et al., 1992; NAVA et al., 1992).

Recentemente, invece, si è potuto evidenziare la differente sensibilità del CL in coniglie pseudogravidiche in relazione al periodo di somministrazione di un analogo sintetico della PGF2α dal 3° al 9° giorno di pseudogravidanza (BOITI et al., 1998). I risultati ottenuti (Figura 7) mostrano che il CL, dal 3° al 5° giorno di psuedogravidanza, è refrattario alla PGF2α, mentre al 6° giorno si osserva una moderata diminuzione della progesteronemia 24 ore dopo il trattamento. Dal 7° all'8° giorno di pseudogravidanza, il numero dei soggetti che risponde positivamente al trattamento con la PGF2α aumenta dal 71 all'83% rispettivamen-

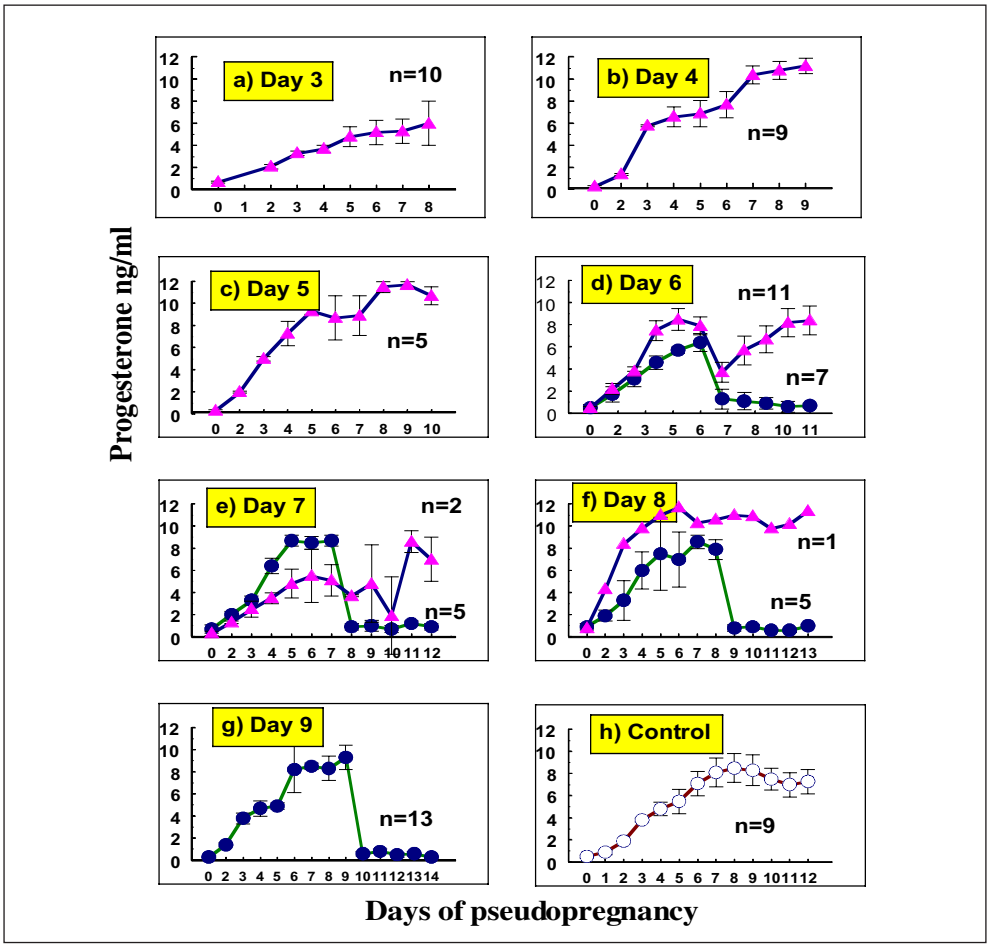


Figura 7.Effetto del trattamento con 200 mg di alfaprostol somministrato tra il 3° e il 9° giorno di pseudogravidanza sulle concentrazioni del progesterone plasmatico periferico in coniglie che rispondono o non rispondono al trattamento (da Boiti C. et al. Prostaglandins & other lipid mediators 1998, 56: 253-264)

te mentre al 9°giorno è efficace al 100%. L'aumento della sensibilità alla PGF2α è direttamente proporzionale alla maturità del CL. La maggiore potenza luteolitica dell'analogo della PGF2α, rispetto a quella naturale potrebbe essere dovuta all'aumento del numero dei recettori per la PGF2α (WAKELING e GREEN, 1981) e/o alla ridotta clearance. E' noto, infatti, che la PGF2α è rimossa dal circolo mediante un unico passaggio nel filtro polmonare (PIPER et al., 1970).

Studio degli effetti in *vitro* della PGF2α

Recentemente si è focalizzata l'attenzione sul ruolo che l'ossido nitrico (NO) potrebbe avere nel modulare la steroidogenesi nel CL durante la pseudogravidanza (GOBBETTI et al., 1999; BOITI et al., 1999). In particolare, sono stati approfonditi i meccanismi che sono indotti dal legame della PGF2α con i suoi recettori e che modulano la produzione di NO. L'ossido nitrico è un radicale che, secondo le recenti acquisizioni, permette la trasmissione del segnale tra cellule (MONCADA et al., 1991). In *vivo*, NO è prodotto in seguito all'ossidazione della L-arginina, grazie all'azione della NO sintetasi (NOS) che produce NO e L-citrullina. In questi studi in *vitro* è stato dimostrato che la PGF2α, ma anche la PGE2, regolano l'attività della NOS, e la produzione di progesterone in modi diversi, dipendenti dall'età del CL. Infatti, al 4° giorno di pseudogravidanza, la PGE2 determina un incremento della produzione di progesterone e una diminuzione dell'attività della NOS, mentre la PGF2α non ha alcun effetto. Al 9° giorno, la PGE2 non ha alcun effetto sul CL, ma la PGF2α determina una aumento pari a due volte e mezzo dell'attività della NOS e una drastica diminuzione della produzione di progesterone (BOITI et al., 2000). Le ragioni di questo comportamento non sono conosciute.

Esistono ancora numerose controversie circa i meccanismi che intervengono nel proteggere il CL dalla luteolisi, indotta dalla PGF2α, nel primo periodo di pseudogravidanza. Probabilmente, il numero dei recettori prostaglandinici sulle cellule luteiniche gioca un ruolo importante nella regolazione dell'attività luteolitica della PGF2α, e ciò potrebbe spiegare la refrattarietà del CL nei primi giorni di pseudogravidanza. La mancanza dell'azione luteolitica della PGF2α sul CL di 4 giorni, potrebbe essere dovuta al ridotto numero dei recettori per questa prostaglandina, o al contrario all'aumento dei recettori per i fattori luteotropi, o antiluteolitici.

La luteolisi strutturale

Il processo involutivo che comporta la trasformazione del CL in "*corpo albicans*", è definito con il termine di luteolisi strutturale. Nella pecora, avvengono nelle cellule luteali numerose e ben evidenti modificazioni morfologiche 24-36 ore dopo il trattamento con PGF2α (SAWYER et al., 1990), benché la loro capacità steroidogenica sia già marcatamente ridotta. Nel processo luteolitico, un ruolo importante è svolto dal sistema immunitario. Durante la luteolisi, i leucociti raggiungono il CL (BRANNSTORM et al., 1993; MURDOCH et al., 1988). In risposta a fattori chemiotattici, gli eosinofili e i macrofagi s'infiltrano nel tessuto luteale in regressione prima che la concentrazione di progesterone nel sangue diminuisca (MURDOCH, 1987). Negli studi condotti sui CL di coniglio, i macrofagi non sembrano coinvolti nella rimozione dei detriti cellulari (KOERING et al., 1978). La loro funzione, insieme alle altre cellule del sistema immunitario, sembra essere quella di regolare la sintesi della PGF2a e la steroidogenesi tramite le citochine (NOTHNICK et al., 1990; BENYO, 1992).

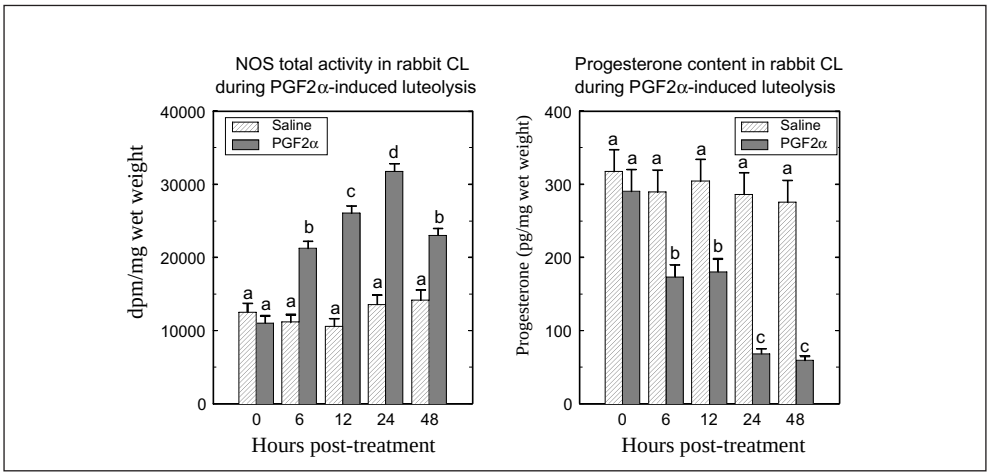


Figura 8. A sinistra l'attività totale della NOS nel corso della luteolisi indotta da PGF2α nei CL di coniglia. A destra il corrispondente contenuto di progesterone. La PGF2 è stata somministrata al 9° giorno di pseudogravidanza. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi per P < 0.001.

Recentemente, mediante tecniche immuno-enzimatiche, è stato dimostrato che la NOS endoteliale (eNOS) è presente nei CL di coniglia ed è localizzata proprio sulle cellule luteali, sia grosse che piccole, in posizione strategica quindi per poter controllare la steroidogenesi del CL (BOITI et al, 2002). Inoltre, anche la NOS inducibile (iNOS) è stata individuata sui CL di coniglie al 4°, 9° e 13° giorno di pseudogravidanza, ma solamente in alcune cellule isolate, probabilmente macrofagi, all'interno o in prossimità dei vasi sanguigni. Entrambe le isoforme della NOS sono poi regolate a livello genico nel corso della pseudogravidanza.

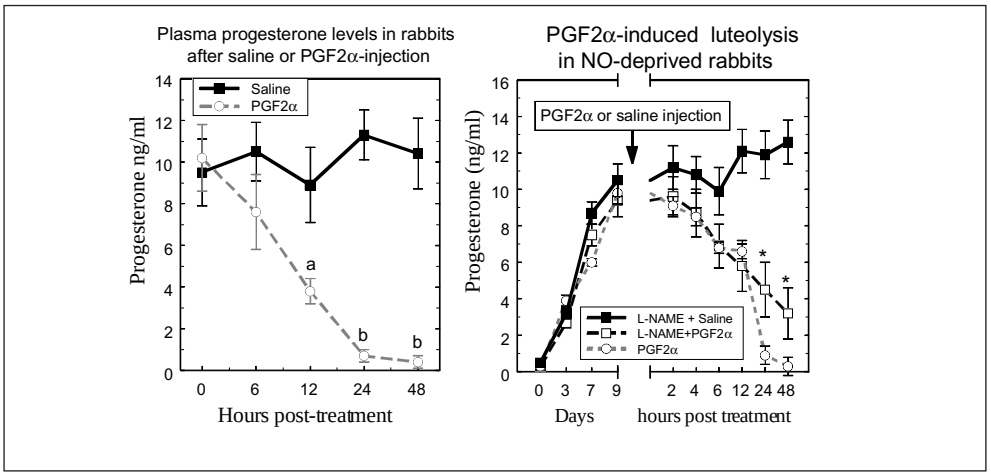


Figura 9. Livelli del progesterone periferico in coniglie trattate con PGF2α e fisiologica (sinistra). A destra profilo del progesterone in coniglie private di NO, tramite trattamento cronico con L-NAME (0.6 g/L per 6 giorni), ed in coniglie di controllo prima e dopo trattamento con PGF2α o soluzione salina al 9° giorno di pseudogravidanza.

Ultimamente, abbiamo studiato la regolazione della NOS, sia costitutiva che inducibile, ed il ruolo dell'ossido nitrico nel corso della luteolisi indotta da PFG2α. E' stato dimostrato che i livelli di RNA messaggero per la eNOS diminuiscono mentre l'espressione della proteina aumenta 6-12 ore dopo il trattamento con un analogo della PGF2α, alfaprsotol. Inoltre, l'attività totale della NOS sono inversamente correlati al contenuto di progesterone nel corpo luteo (Figura 8).

Infine, il trattamento prolungato con L-NAME, blocca parzialmente l'azione luteolitica indotta dalle prostaglandine (Figura 9). Sulla scorta di questi risultati, è stata ulteriormente rafforzata l'ipotesi che l'ossido nitrico possa essere un mediatore della regressione luteinica nel coniglio (BOITI et al., 2003).

MECCANISMO D'AZIONE DELLA PGF2α NELLA LUTEOLISI

I recettori prostaglandinici

L'azione luteolitica della PGF2α è l'espressione della sua interazione con specifici recettori posti sulle membrane citoplasmatiche delle cellule bersaglio. La prima diretta prova della loro esistenza fu fornita da Fried et al (1969), mediante l'uso di un antagonista inattivo della PGF2α, il **7-** ossacetilenico, che legandosi ai siti recettoriali, inibiva l'azione utero tonica della PGF2α. Successivamente, fu possibile individuare la localizzazione di questi recettori utilizzando PGF2α marcate con isotopi radioattivi. I siti di legame furono identificati in diversi tessuti, compreso il CL di molte specie animali La presenza di tali recettori è stata dimostrata anche sul CL di coniglie durante la fase di pseudogravidanza, sia all'inizio, che a metà e in tarda fase luteale (BOITI et al., 2000). Indipendentemente dall'età del CL, le cellule luteali possiedono sulla loro membrana plasmatica siti di legame per le prostaglandine, sia per la PGF2α sia per la PGE2. Nelle condizioni in cui tale studio è stato compiuto, le caratteristiche di questi siti lasciano supporre l'esistenza di un unico modello recettoriale per la PGF2α.

L'affinità e la concentrazione dei recettori per la PGF2a sulle cellule luteali del coniglio, sono stati esaminati mediante l'uso di tecniche radioisotopiche su CL prelevati da coniglie al 4°, 9° e 13° giorno di pseudogravidanza in relazione alla diversa sensibilità per la PGF2α in vivo (BOITI et al., 1998). E' stato dimostrato che l'attività della NOS era inferiore al 9° giorno di pseudogravidanza rispetto ai giorni 4 e 13 mentre la produzione di progesterone era più elevata nel 4° giorno rispetto al 9° e al 13°. In tutte le colture di CL, indipendentemente dalla loro età, il trattamento con L-NAME, un inibitore della NOS, comportava una diminuzione dell'attività della NOS e parallelamente un aumento della secrezione di progesterone. Nel CL, sia al 9° sia al 13° giorno, l'attivazione del sistema della proteina Gp determinava un marcato effetto luteolitico simile a quello osservato dopo trattamento con PGF2α.

L'azione luteolitica della PGF2α sul CL del coniglio, dipende dalla disponibilità di recettori funzionali sulle cellule luteali bersaglio, e, dopo il legame con il recettore, appare essere mediata da diversi meccanismi di trasduzione del segnale con il coinvolgimento di secondi messaggeri. A seguiro del legame con i recettori per la PGF2α l'attività della NOS aumenta rapidamente mentre viene inibita la secrezione del progesterone (GOBBETTI et al., 1999; BOITI et al., 2000). La luteolisi non si osserva nel caso in cui alla coltura sia aggiunto L-NAME. Questi dati confermano l'importanza dell'attività della NOS nel processo luteolitico indotto dalla PGF2α nel coniglio. È probabile che l'attività della NOS sia regolata dalla mobilizzazione del Ca^{2+} che si ha dopo trattamento con la PGF2α. Infatti, è

certo che nelle cellule endoteliali è richiesto il Ca^{2+} per il legame della NOS costitutiva con la calmodulina e attivare la produzione di NO (BREDT e SNYDER 1990). La PGF2α determina l'attivazione della PLC e quindi aumenta il contenuto intracellulare del diacilglicerolo (DAG) e dell'inositolo 3- fosfato (InP_3); DAG attiva la PKC, mentre InP_3 libera il Ca^{2+} intracellulare (WILTBANK et al., 1991).

L'azione luteolitica della PGF2α dipende chiaramente, dall'età del CL (MARCINKIEWICZ et al., 1992). Sulla base dei risultati ottenuti, ciò potrebbe essere dovuto al ridotto numero dei recettori per la PGF2α, su di un CL giovane, ma anche al più alto numero di recettori per la PGE_2, che mandano segnali luteotropici ma anche antiluteolitici. In aggiunta a quest'ipotesi, non si potrebbe escludere l'intervento anche di un disaccoppiamento della proteina G al recettore della PGF2α. Infatti, l'aggiunta di attivatori per gli enzimi PLC e PKC determina un marcato effetto luteolitico, non solo al 9° e al 13° giorno di pseudogravidanza, ma anche al 4° quando la prostaglandina è completamente inefficace.

Effetti della PGF2α sul flusso ematico ovarico

In numerose specie animali la luteolisi dipende, oltre che dalla presenza dell'utero, anche dall'integrità del sistema vascolare utero-ovarico. La PGF2α ha specifiche attività vasocostrittrici a livello del tessuto uterino. E' verosimile ipotizzare che questa sua azione vasocostrittrice si esplichi anche con una riduzione del flusso ematico delle ovaie. L'aumento delle resistenze vascolari a livello del CL potrebbe privare la ghiandola del nutrimento necessario per la propria sopravvivenza e dei substrati essenziali per la steroidogenesi e determinare la regressione luteinica, (PHARRIS et al., 1970). Gli esperimenti condotti sull'ovino evidenziano che in questa specie animale la somministrazione di PGF2α provoca la diminuzione del flusso ematico luteinico e, parallelamente, una diminuzione della secrezione di progesterone (NETT et al., 1976; NISWENDER et al., 1973). Poiché le cellule endoteliali possiedono recettori per la PGF2α la sua azione potrebbe essere rivolta anche a questa popolazione cellulare (MAMLUK et al., 1998). Infatti, la PGF2α provoca la degenerazione delle cellule endoteliali del CL (O'SHEA et al., 1977; SAWYER et al., 1990), la diminuzione della densità dei capillari luteinici (AZMI et al., 1984; BRADEN et al., 1988; NETT et al., 1976), e quindi la diminuzione del flusso ematico.

Utilizzando tecniche radio-isotopiche in coniglie pseudogravide, si è potuto osservare una riduzione del 25% del flusso ematico luteinico dopo somministrazione endovenosa di PGF2α senza che nessun'alterazione rilevante al flusso ovarico totale (NOVY, 1972). In realtà gli studi condotti nel coniglio hanno permesso di concludere che le variazioni del flusso ematico luteinico, indotte dalla PGF2α non sono responsabili della regressione luteinica né della diminuzione della concentrazione plasmatici di progesterone, in quanto cronologicamente non precedono l'inizio della luteolisi ma sono successivi ad essa.

Azione della PGF2α sulla steroidogenesi

La PGF2α determina una diminuzione della sintesi del progesterone da parte delle cellule luteiniche in diverse specie animali, bovina, ovina, suina, nei primati e anche nel coniglio, sia nella fase di pseudogravidanza sia durante la gestazione (NISWENDER et al., 1994). Esistono probabilmente, diversi meccanismi mediante i quali la PGF2α determina la diminuzione della sintesi e della secrezione del progesterone, tra cui:

1. l'inibizione dei recettori per gli ormoni luteotropi.

2. la diminuzione del trasporto del colesterolo attraverso la cellula e/o attraverso la membrana mitocondriale,
3. l'inibizione dell'attività degli enzimi necessari alla sintesi del progesterone.

Poiché la sintesi del progesterone dipende dagli ormoni luteotropici, si può ipotizzare che la PGF2α riduca la sensibilità delle cellule luteiniche a tali ormoni. Infatti, il trattamento con PGF2α nelle pecore determina una rapida diminuzione dell'RNA messaggero che codifica i recettori dell'LH (GUY et al., 1995; SMITH et al., 1996). Poiché si è osservato che il trattamento con PGF2α determina nelle cellule luteiniche una diminuzione dell'attività dell'adenilato ciclasi e contemporaneamente un aumento dell'attività della fosfodiesterasi (AGUDO et al., 1984; GARVERICK et al., 1985) è probabile che la diminuzione della sintesi del progesterone dipenda da questi effetti.

E' stato anche ipotizzato che gli effetti antisteroidogenici della PGF2α siano dovuti all'inibizione dell'entrata delle lipoproteine nelle cellule luteiniche (RODGERS et al., 1987; TANDESKI et al., 1996; TANDESKI et al., 1996; WILTBANK et al., 1990) o al trasporto del colesterolo all'interno della cellula luteinica stessa, dal citoplasma al mitocondrio, dove sono presenti gli enzimi necessari alla sintesi del pregnenolone (McLEAN et al., 1995;) o alla destrutturazione del citoscheletro (MURDOCH, 1988)

La PGF2α non agisce negativamente sulla diminuzione della secrezione di progesterone, né diminuendo l'espressone dell'RNAm codificante per la P-450, né agendo sull'attività di tale complesso enzimatico (BELFIORE et al., 1994; GRUSENMEYER et al., 1992; McGUIRE et al., 1994; ROGERS et al., 1995; TJAN et al., 1994; WILTBANK et al., 1993), mentre diminuisce l'RNAm codificante per la 3beta-idrosteroide deidrogenasi (HAWKINS et al., 1993; TJAN et al., 1994) anche se non si osserva alcuna variazione né sulla concentrazione di quest'enzima né sulla sua attività (JUNGEL et al., 1998; RODGERS et al., 1995).

Anomalie della funzionalità ovarica

Nella coniglia, come già detto precedentemente, le concentrazioni del progesterone permangono costantemente su valori basali indipendentemente dal susseguirsi delle fasi ovariche di ciascun ciclo estrale. Solamente nel caso di accoppiamento o di trattamento con GnRH o con gonadotropine (hCG, LH), in conseguenza dell'ovulazione così provocata, il progesterone presenta un rapido innalzamento che permane per un periodo variabile a seconda che la coniglia rimanga gravida o meno. Tuttavia, esaminando il progesterone nel corso del postparto si possono riscontrare profili anomali, alcuni dei quali rispecchiano nella forma e nella durata la pseudogravidanza, mentre altri sono caratterizzati da picchi di breve durata di 4-6 giorni (BOITI et al., 1996). Sono state formulate diverse ipotesi circa l'origine del progesterone che si può riscontrare in coniglie né accoppiate né sottoposte a trattamenti ormonali. In alcuni casi, peraltro molto limitati, è possibile che la causa sia da imputare a vere e proprie ovulazioni spontanee in particolare per quei soggetti che presentano un profilo simile a quello della pseudogravidanza. Questa ipotesi è suffragata dalla osservazione a posteriori di numerosi CL nelle ovaie delle stesse coniglie sacrificate subito dopo l'ultimo prelievo. Negli altri casi, quelli caratterizzati da un profilo altalenante del progesterone, si possono ipotizzare altre cause (parziale luteinizzazione di follicoli, iperstimolazione del tessuto interstiziale, etc.) ancora da verificare sperimentalmente.

Se ci limita all'esame del progesterone all'8° e all'11° giorno postaparto, i giorni generalmente utilizzati per il trattamento di induzione dell'estro il primo e per la fecondazione artificiale (f.a.) il secondo, teoricamente saranno possibili quattro profili alternativi di cui solo uno normale (figura 10).

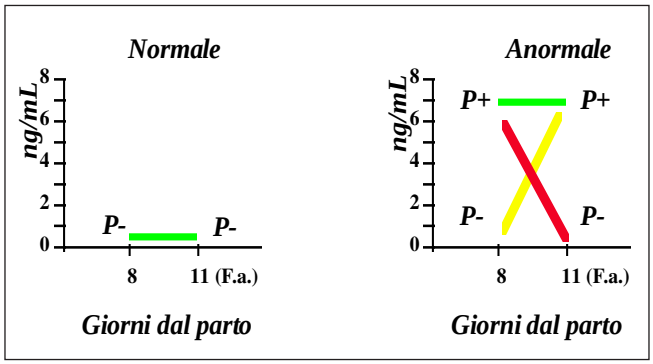


Figura 10. Quattro possibili profili del progesterone all'8° e all'11° giorno postparto.

Qui, indipendentemente dai valori esemplificati, faremo riferimento alle coniglie P+ per indicare quelle che presentano una progesteronemia superiore a 2 ng/ml e alle coniglie P- per quelle con progesterone inferiore a 2 ng/ml. Questo valore soglia non è stato scelto arbitrariamente, ma sulla base di indicazioni sperimentali riportate da SETTY e MILLS (1987) dalle quali è emerso che un solo corpo luteo secerne una quantità di progesterone tale da mantenere una concentrazione nel sangue periferico pari a circa 1.7 ng/ml.

La frequenza delle coniglie P+, cioè quelle con alto progesterone all'8° e/o all'11° giorno postparto varia da allevamento ad allevamento e va da un minimo del 5% ad un massimo del 38% in alcune situazioni particolari (BOITI et al., 1996). Non è stata identificata alcuna causa specifica, ma è probabile che il fattore "ambientale" abbia una notevole rilevanza. La frequenza media si dovrebbe assestare intorno ad un 6-10%. Tuttavia, considerato il ruolo svolto dall'endometrio nell'indurre la luteolisi è probabile che i soggetti colpiti da endometrite presentino un aumento della durata dell'attività luteale come dimostrato sperimentalmente da BOITI et al., (1999) nella coniglia. Un dato apparentemente trascurabile quindi se riferito ai grandi numeri, ma di notevole interesse pratico e scientifico.

Ma quali sono gli effetti di una elevata progesteronemia sui parametri riproduttivi? Per quanto riguarda la recettività appare evidente come le coniglie P+ siano significativamente meno recettive rispetto a quelle classificate come P-, 54% contro 13%. Anche la fertilità è risultata significativamente depressa nelle coniglie P+, mentre il numero dei nati vivi non è stato influenzato dal progesterone alto o basso (BOITI et al., 1996). Analogamente, le elevate concentrazioni di progesterone non influenzano l'ovulazione, così come si può dedurre dai parametri ovulatori analizzati su coniglie sacrificate 48 ore dopo la FA per studiare la qualità degli embrioni (STRADAIOLI et al., 1993) e il loro grado di sviluppo dopo 72 ore di coltura in vitro. D'altro canto, però, dalle coniglie P+ si recupera un minore numero di embrioni, molti dei quali sono anche non fertilizzati o degenerati (BOITI et al., 1996).

BIBLIOGRAFIA

1) ABRAMOWITZ J., L. BIRNBAUMER. Temporal characteristics of gonadotropin interaction with rabbit luteal receptors and activation of adenylyl cyclase: comperison to the mode of action of catecholamine receptor. *Endocrinology.* 111: 970-976; 1982.

2) ALLEN W.M., G.W. CORNER. Physiology of the corpus luteum. VII. Maintenance of pregnancy in rabbit after very early castration by corpus luteum extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 27 : 403-405 ; 1930.

3) ANDERSON L.L., BLAND K.P., R.M. MELAMPY. Comparative aspect on uterine- luteal relationship. *Rec.prog. Horm. Res.* 25: 57-104; 1969.

4) ARAKANE F., SUGAWARA T., NISHINO H., LUI J., HOLT A., PAIN D., STOCCO D.M., MILLER W.L., F.J. STRAUSS III. Steroidogenic acute regulatory protain (StAR) retains activity in absence of its mitochondrial import sequence: implicatios for the mechanism of StAR action. *Proc. Natl.Acad. Sci.* USA 93: 13731-13736, 1996.

5) AIQUA R.K., FERAL C., BENHAIM A., DELARUE B., P. LEYMARIE. Luteortophic factor in hyperstimulated pseudopregnant rabbit: I-evidence for aromatase activity in luteal tissue and luteal cells. *J. Endocrinol.* 154: 249-257; 1997.

6) AULETTA F.J. A.P.F. and FLINT. Mechanisms controlling corpus luteum function in sheep, cows, non-human primates, and women, especially in relatio to time of luteolisi. *Endocr. Rev.* 9:88-105, 1988.

7) AZMI T.I., J.D. O'SHEA. Mechanism of deletion of endothelian cells during regression of corpus luteum. *Lab. Invest.* 51: 206-217, 1984.

8) BAHR J.M., N. BEN-JONATHAN. Ovarian catecholamines during the pre-pubertal period and reproductive cycle of several species. In: Ben-Jonathan N, Barh Jm, Weiner RI, eds. *Catecholamines as Hormone Regulators.* New York:Raven Press, 279-292; 1985.

9) BEHRMAN H.R., LUBORSKY-MOORE J.L., PANG C.Y., WRIGHT K., L.J. DORFLINGER. Mechanisms of PGF2alfa action in functional luteolysis. In: Channing CP, Marsh J, Sadler WA, eds. *Ovarian Follicular and Corpus Luteum Fuction, Advances in Exsperimental Medicine and Biology,* Vol. 112: 557-571;New York: Plenum Press 1979.

10) BELFIORE C.J., HAWKINS D.E.., WITBANK M.C., G.D. NISWENDER. Regulation of cytochrome P-450scc synthesis and activity in the ovine corpus luteum. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 51: 283-290, 1994.

11) BILL C.H. II, P.L. KEYES. 17beta-estradiol maintains normal function of corpora lutea throughout pseudopregnancy in hypophysectomized rabbits. *Biol. Reprod.* 28: 608-617; 1983.

12) BIRNBAUMER L., YANG P.C., HUNZICKER-DUNN M., BOCKAERT J., J.M. DURAN. Adenylil cyclase activities in ovarian tissue. I. Homogenization and conditions of assay in Graafian follicles and corpora lutea of rabbit, rats and pigs: regulation by ATP, and some comparative properties. *Endocrinology.* 99: 163-184; 1976.

13) BOITI C., CANALI C., MONACI M., STRADAIOLI G., VERINI SUPPLIZI A., VACCA C., CASTELLINI C., FACCHIN E. Effect of postpartum progesterone levels on receptivity, ovarian response, embryo quality and development in rabbits. 6th World Rabbit Congress Toulouse 9-12/07/1996 Vol.2, 45-49.

14) BOITI C., CANALI C., ZERANI M., A. GOBBETTI. Changes in refractoriness of rabbit corpora lutea to a prostaglandin F_{2alfa} analogue, alfaprostol, durino pseudopregnancy. *Prostaglandins* 56: 255-264; 1998.

15) BOITI C., CANALI C., BRECCHIA G., ZANON F., E. FACCHIN. Effect of induced endometritis on the life span-of corpora lutea of pseudopregnant rabbits and incidence of spontaneus uterine infections on fertil does. *Theriolenology.* 52: 1123-1132; 1999.

16) BOITI C., ZERANI M., ZAMPINI D., A. GOBBETTI. Nitric oxide synthase activity and progesterone release by isolated corpora lutea of rabbits in early- and mid-luteal phase of pseudopregnancy are differently modulate by prostaglandin E2 and prostaglandin F2alfa via adenilate cyclase and phospolipase C. *Journal of Endocrinology* 164: 179-186; 2000.

17) BOITI C., ZERANI M., ZAMPINI D., GOBBETTI A. Nitric oxide synthase activity and progesterone release by corpora lutea of rabbits in early- and mid-luteal phase of pseudopregnancy are differently modulated by prostaglandin E2 and prostaglandin F2a via adenylate cyclase and phospholipase C Journal of Endocrinology 164: 179-186, 2000

18) BOITI C. A review of luteolytic and luteotrophic effects of prostaglandins on the corpus luteum of pseudopregnant rabbits: some *in vivo* and *in vitro* insights. World Rabbit Science 7: 221-228, 1999.

19) BOITI C, ZAMPINI D., ZERANI M., GUELFI G., GOBBETTI A. Prostaglandin receptors and role of G protein-activated pathways on corpora lutea of pseudopregnant rabbit *in vitro*. Journal of Endocrinology 168:141-151, 2001.

20) BOITI C, ZAMPINI D., GUELFI G., PAOLOCCI F., ZERANI M., GOBBETTI A. Expression pattern of endothelial and inducible Nitric Oxide Synthase isoforms in corpora lutea of pseudopregnant rabbits at different luteal stages Journal of Endocrinology 173: 285-296, 2002.

21) BOSHIER D.P. e H. HOLLOWAY. Effects of ovarian steroid hormones on histochemically demonstrable lipids in the rat uterine epithelium. *J. Endocrinol*. 56: 59-67; 1973.

22) BOSHIER D.P., HOLLOWAY H., e N.M. MILLENER. Triacylglycerols in the rat uterine epithelium during the oestrus cycle and early pregnancy. *J.Reprod. Fertil.* 62: 441-446, 1981.

23) BRADEN T.D., GAMBONI F., G.D. NISWENDER. Effects of pgf_{2alfa}-induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 39: 245-253, 1988.

24) BRANNSTROM M., R.J. NORMAN. involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum. Reprod.* 8: 1762-1775, 1993.

25) BREDT D.S., S.H. SNYDER. Isolation of nitric synthetase, a calmodulin requireng enzyme. *PNAS* 87: 682-685; 1990.

26) BROWNING J.M., KEYES P.L., C. WOLFR. Comparison of serum progesterone, 20 alfa dihydroprogesterone and estradiol-17beta on pregnant and pseudopregnant rabbits: evidence for postimplantation recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.* 23: 1014-1019; 1980.

27) D. BULMER. The histochemistry of ovarian macrophages in the rat. *J. Anat.* 98: 313-319, 1964.

28) BUTCHER R.L., BARLEY D.A., E.K. INSKEEP. Local relationship between the ovary and uterus of rats and guinea pigs. *Endocrinology* 84: 476-481; 1969.

29) CARNEGIE J.A., DARDICK I., B.K. TSANG. Microtubules and the gonadotropic regulation of granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology* 120: 819-828, 1987.

30) CARNEGIE J.A., B.K. TSANG. The cytoskeleton and rat granulosa cell steroidogenesis: possible involvment of microtubules and microfilaments. *Biol. Reproud.* 38: 100-108; 1988.

31) C.P. CHANNING. Steroidogenesis and morphology of human ovarian cell types in tissue culture. *J. Endocrinol.* 45: 297-308; 1969.

32) C.P. CHANNING. Tissue culture of equine ovarian cell types: culture methods and morphology. *J. Endocrinol.* 43: 381-390; 1969.

33) CHEGHINI N., LEI Z.M., RAO C.V., W. HANSEL. Cellular distribution and cycle phase dependency of gonadotropin and eicosanoid binding sites in bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 45: 506-513; 1991.

34) CORNER G.W., W.M. ALLEN. Normal growth and implantetion of embryos after vesy early abltion of the ovaries, under the influence of extracts of the corpus luteum. *Am. J. Physiol.* 88: 340-346; 1929.

35) DAMLE S., LABARBERA A.R., M. HUNZICKER-DUNN. Progesterone production by rabbit corpora lutea *in vitro*: regulation by LH and epinephrine. *Biol Reprod* 1984; 30(suppl 1): 115(abst).

36) DAY S.L., L. BIRNBAUMER. The effect of estradiol on hormonally stimulable adenylil cyclase activity and on progesterone production in normal and regressing corpora lutea from control and human gonadotropin-treated psudopregnant rabbits. *Endocrinology.* 106: 375-381; 1980.

37) DAY S.L., L. BIRNBAUMER. Corpus luteum function and adenylyl cyclase stimulability in the rat after an estradiol benzoate-induced ovulatory surge of luteinizing hormone-induced ovulatory surge of luteinizing hormone: role of prolactin. *Endocrinology.* 106: 382-389; 1980.

38) R. DE GRAAF. De Mullierum Organis Generationi Inservientibus. Leyden, 1672, translated by G.W. Corner. In: *Essay in Biology.* Berkeley, CA: Univ. of California Press, 1943.

39) DEL CAMPO C.H., O.J. GINTHER. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: guinea pigs, rats, hamster and rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 33: 2561-2578;1972.

40) DHARMARAJAN A.M., BRUCE N.W., G.T. MEYER. Quantitative ultrastructural characteristics relating to transport between luteal cell cytoplasm and blood in the corpus luteum of pregnant rat. *Am. J. Anat.,*172: 87-99, 1985.

41) DHARMARAJAN A.M., SUEOKA K., MIYAZAKI T., ATLAS S.J., GHODGAONKAR R.B., DUBIN N.H., ZIRKINAND B.R., EE. WALLACH. Prostaglandin and progesterone secretion in the *in vitro* perfused psuedopregnant rabbit ovary. *Endocrinology* 124: 1198-1203; 1989.

42) DOYLE L.L., BARCLAY D.L., DUNCAN G.W., K.T. KIRTON. Human luteal function following hysterectomy as assessed by plasma progestin. *Am. J. Obstet. Gynecolog*. 110: 92-97; 1971.

43) du MENSIL du BUISSON F. Regression unilaterale des corpes jaunes apres hysterectomie partielle chez la truie. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 1: 105-112; 1961.

44) EGLINTON G., RAPLAEL R.A., SMITH G.N., HALL, PICKLES. Isolation and identification of two smooth muscle stimulants from menstrual fluid. *Nature* 200: 960-993; 1963.

45) ENDERS A.C. Cytology of the corpus luteum. *Biol. Reprod.* 8:158-182; 1973.

46) EPSTEIN L.R., N.R. ORME-JOHNSON. Regulation of steroid hormone biosynthesis. Identification of precursors of a phosphoprotein targeted to the mithocondria in simulated rat adrenal cortex cells. *J. Biol. Chem.*266: 19739-19745; 1981.

47) FERGUSSON J.K.W. A study of the mobility of intact uterus at term. *Surg. Gynecol. Obstet.* 73: 359-366; 1941.

48) FERRUZ J., BARRIA A., GALLEGUILLOS X., H.E. LARA. Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins. *Biol. Reprod.* 45: 592-597; 1991.

49) FERRUZ J., AHMED C.E., OJEDA S.R., H.E. LARA Norepinephrine release in the immature ovary is regulated by autoreceptor and neuropeptide-Y. *endocrinology.* 130: 1345-1351; 1991.

50) FRAENKEL L. Die Funktion des Corpus luteum. *Archiv. Gynaekol. (Munich)* 68: 438-443; 1903.

51) FLETCHER P.W., G.D. NISWENDER. Effect of PGF2alfa on progesterone secretion and adenylate cyclase activity in ovine luteal tissue. *Prostaglandins* 20: 803-818; 1982.

52) FLOWER R.J., E.L. SHELDRICK. Evidence a systemic roule for ovarian oxitocin in luteal regression in sheep. *J. Reprod. Fertil.* 67: 215-225; 1982.

53) FRIED J., SANTHANAKRISHNAN T.S., HIMIZU J., LIN C.H., RUBIN B., E.O. GRIGAS. Prostaglandin antagonists: synthesis and smooth muscle activity. *Nature* 223: 208-210; 1969.

54) GADSBY J.E., BALAPURE A.K., BRITT J.H., T.A. FITZ Prostaglandin F_{2alfa}receptors on enzyme-dissociated pig luteal cells throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 126: 787-795; 1990.

55) GARRIDO C.S., SIMON S., D. GOSPODAROWICZ. Transcriptional regulation of vascular endothelian growth factor gene expressio in ovarian granulosa cells. *Growth Factors* 8: 109-117, 1993.

56) GARVERICK H.A., SMITH M.F., ELMORE R.G., MOREHOUSE G.L., AGUDO S.P.L., W.L. ZAHLER. Changes and interrelationships among luteal LH receptor, adenylate cyclase activity and phosphodiesterase activity during the bovine estrus cycle. *J. Anim. Sci.* 61: 216-223, 1985.

57) GEMELL R.T., STACY B.D., D. THORNBURNG. Morphology of the regressing corpus luteum in the ewe. *Biol. Reprod.* 14: 270-279, 1976.

58) GINTHER O.J., N.L. FIRST. Maintenance of corpus luteum in hystorectomized mares. *Am J Vet Res* 32: 1687-1691;1971.

59) GINTHER O.J., WOODY C.O., MAHAJAN S., JANAKIRAMAN K., L.E. CASIDA. Effect of oxytocin administration on the oestrus cycle of unilaterally hysterectomized heifers. *J Reprod Fertil* 14: 225-229;1967.

60) GOBBETTI A., BOITI C., CANALI C., M. ZERANI. Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by *in vitro* cultured rabbit corpora lutea. *Journal of Endocrinology* 160: 275-283; 1999.

61) GOLDSMITH L.T., GROB H.S., SCHERER K., SURVE A., STEINMETZ G.B., G. WEISS. Placental control of ovarian immunoreactive relaxin secretion in the pregnant rat .*Endocrinology* 109: 548-552; 1981.

62) GOSPODAROWICZ D., CHENG J., LUI G.M., P. BOHLEN. Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology.* 117: 2283-2391; 1985.

63) GOSPODAROWICZ D., K.K. THAKRAL. Production of a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 75: 847-851; 1978.

64) GRAZUL-BILSKA A.T., REDMER D.A., KILLILEA S.D., KRAFT K.C., L.P. REYNOLDS. Production of mitogenic factor(s) by ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 130: 3625-3632; 1992.

65) GRUSENMEYER D.P., J.L. PATE. localization of prostaglandin F_{2alfa} inhibition of lipoprotein use by bovine luteal cells. *J. Reprod. Fertil* 94: 311-318; 1992.

66) GUTKNECHT G.D., DUNCAN G.W., L.J. WYNGARDEN. Inhibition of prostaglandin F_{2alfa} or LH-induced luteolysis in the psudopregnant rabbit by 17beta-estradiol. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.* 139: 406-410; 1972.

67) GUY M.K., JUNGEL J.L., TANDENSKI T.R., And G.D. NISWENDER. steady-state concentration of mRNA encoding the receptor for luteinizing hormone during the estrous cycle and following prostaglandin F_{2alfa} treatmen of ewes. *Endocrine* 3: 585-589; 1995.

68) HANUKOGLU I. Steroidogenic enzymes: structture, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthetis. *J. Steroid. Biochem* 43: 779-804; 1992.

69) HAWKINS D.E., BELFIORE C.J., KILE J.P., G.D. NISWENDER. regulation of messanger ribonucleic acid encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/ delta 5-delta 4-isomerase in the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 48: 1185-1190; 1993.

70) HERNANDEZ E.R., JIMENEZ J.L., PAYNE D.W., E.Y. ADASHI. Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthetis is mediated via $beta_2$-adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology.* 122: 1592-1602.

71) HILLIARD J. Corpus luteum function in guinea pigs, hamsters, rats, mice, and rabbit. *Biol. Reprod.* 8: 203-211; 1973.

72) HOLT J.A. Regulation of progesterone production in the rabbit corpus luteum. *Biol. Reprod.* 40:201-208;1999.

73) HOYER P.B., KEYES P.L., G.D. NISWENDER. Size distribution and hormonal responsiveness of dispersed rabbit luteal cells during pseudopregnancy. *Biol. Reprod.* 34: 905-910; 1986.

74) HUNTER G.L., L.E. CASIDA. Absence of local effects of the rabbit uterus on weight of corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 13: 179-181; 1995.

75) HUNZICKER-DUNN M. Epinephrine-sensitive adenylil cyclase activity in rabbit ovarian tissue. *Endocrinology.* 110: 233-240; 1982.

76) HUNZICKER-DUNN M., DAY S.L., ABRAMOWITZ J., L. BIRN BAUMER. Ovarian responses of pregnant mare serum gonadotropin- and human chorinic gonadotropin-primed rats: desensitizing, luteolytic, and ovulatory effects of a single dose of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology.* 105: 442-451; 1976.

77) IKONEN E. Molecular mechanisms of intracellular cholesterol transport. *Curr. Opin.Lipidol.* 8:60-64;1997.

78) INSKEEP E.K., R.I. BUTCHER. Local component of utero-ovarian relationships in the ewe.*J Anim Sci* 25:1164-1168;1966.

79) JACKOB W., JENTZSCH K.D., MAUERSBERGER B., P. OEHME. Demostration of angiogenic-activity in the corpus luteum of cattle. *Exp. Pathol.* 13: 231-236; 1977.

80) JONES P.B.C., A.J.W. HSUEH. Regulation of progesterone metabolizing enzyme by adrenergic agents, prolactin and prostaglandins in culture rat ovarian tissue. *Endocrinology.* 109: 1347-1354; 1981.

81) JUENGEL L.J., LARRICK T.L., MEBERG B.M., G.D. NISWDENDER. Luteal expression of steroidogenic factor-1 mRNA during the estrous cycle and in response to luteotropic and luteolytic stimuli in ewes. *Endocrine.* In Press.

82) JUENGEL L.J., MEBERG B.M., McINTUSH E.W., SMITH M.F., G.D. NISWENDER. Concetration of mRNA encoding 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta^5, delta^4 isomerase (3 beta-HSD) and 3beta-HSD enzyme activity following treatment of ewes with prostaglandin F_{2alfa}. *Endocrine.*8:45-50;1998.

83) JUENGEL L.J., MEBERG B.M., TURZILLO A.M., NETT T.M., G.D. NISWENDER. Hormonal regulation of mRNA encoding steroidogenic acute regulatory protein in ovine corpora lutea. *Endocrinology* 136:5423-5429;1995.

84) JUENGEL J.L., NETT T.M., ANTHONY R.V., G.D. NISWENDER. Effects of lutheotropic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insuline-like growth I and growth hormone receptor in th ovine corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* 110: 291-298; 1997.

85) JUENGEL L.J., NETT T.M., TANDESKI T.M., ECKERY D.C., SAWYER H.R., G.D. NISWENDER. Effect of luteinizing hormone and growth hormone on luteal development in hypophysectomized ewes. *Endocrine.* 3:323-326;1995.

86) KARSCH F.J., ROCHE, J.F., NOVEROSKE J.W., FOSTER D.L, NORTON H.W, A.V. NALBANDOV. Prolonged maintenance of the corpus luteum function of the ewe by continuos infusion of luteinizing hormone. *Biol. Reprod.* 4: 129-136; 1971.

87) KEHL S.J., J.C. CARLSON. Assessment of the luteolytic potency of various prostaglandin in the psuedopregnant rabbit. *J. reprod. Fert.* 62: 117-122; 1981.

88) KEYES P.L., GADSBY J.E., YUH K-C M., BILL CH. II. The corpus luteum. In: Greep RO, ed. *International Review of Physiology Reproductive Physiology,* Vol. 4. Baltimore, MD: University Park Press, 57-97;1983.

89) KHACHIGIAN L.M., LINDER V., WILTBANK A.J., T. COLLINS .Egr-1-induced endothelian gene expression: a common theme in vascular injuri. *Science* 271: 1427-1431; 1996.

90) KOOS R.D. Increased expression of vascular endothelial growth / permeabilty factor in the rat ovary following an ovulatory gonadotropin stimuls: potential roles in follicle rupture. *Biol. Reprod.* 52: 1426-1435; 1995.

91) LEDWITZ-RIGBY F., B.W. RIGBY. Ovarian inhibitors and stimulators of granulosa cell maturation and luteinization. In : Franchimont P, channing CP, eds. *Intragonadal regulation of reproduction.* London: Academic Press, 97-131; 1981.

92) LEDWITZ-RIGBY F., B.W. RIGBY. The action of follicular fluid factors on steroidogenesis by culture ovarian granulosa cells. *J. Steroid. Biochem.* 19: 127-131; 1983.

93) LIN D., SUGAWARA T., STRAUSS III J.F., CLARK B.J., STOCCO D.M., SAENGER P., ROGOL A., W.L. MILLER. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis.*Science.* 267: 1828-1831 1995.

94) LYTTON F.D.C., N.L. PYSER. Concentration of PGF2alfa and PGE2 in the uterine venous blood of rabbit during pseudogravidancy and pregnancy. *J Reprod Fertil* 64: 1164-1168;1982.

95) LOEB L. The effect of extirpetion of the uterus on the life and fuction of CL in guinea pigs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 20: 441-443 ; 1923.

96) LOEB L. Effect of hysterectomy on system of sex organs and on periodicity of sexual cycle in guinea pigs. *Am. J. Pyisiol.* 83: 202-224; 1927.

97) MALPIGHI M. *De Structura Glandarum Conglobatarum.* London: Apud Richardum Chiswell; 1689.

98) MAMLUK R., CHEN D., GREBER Y., DAVIS J.S, R. MEIDAN. Charactherization of messenger ribonucleic acid expression for prostaglandin F_{2alfa} and luteinizing hormone receptors in varius bovine luteal cell types. *Biol Reproud* 58: 849-856; 19998.

99) MARCINKIEWICZ J.L., MOY E.S., J.M. BAHR. Changes in responsiveness of rabbit corpus luteum to prostaglandin F_{2alfa} during pregnancy and psuedopregnancy. *J. Reprod. Fertil.* 94: 305-310; 1992.

100) McGUIRE W.J., HAWKINS D.E., G.D. NISWENDER. Activation of protein kinase (PK)-C inhibits progesterone production *in vivo. Biol. Reprod.* 46 (suppl 1): 84(abst); 1992.

101) McLEAN M.P., BILLHEIMER T.J., WARDEN J.K., R.B. IRBY. Prostaglandin F_{2alfa} mediates ovarian sterol carrier protein-2 expression during luteolysis. *Endocrinology.* 136: 4963-4972; 1995.

102) McLEAN M.P., DERICK R.J., J.B. MILLER The effect of human Chorionic Gonadtropin, dybutyl cyclic Adenosine 3',5'-monophosphate, prostaglandin, and 25-hydroxycholesterol on acute progesterone secretion by dissociated rabbit luteal cells in vitro: evidence for indipendent effect of human Chorionic Gonadotropin and lipoproteins. *Biol. Reprod.* 36: 854-863; 1987.

103) McLEAN M.P., J.B. MILLER Steoidogenic effect of 17beta-estradiol on rabbit luteal cells in vitro: estrogens-induced maintenance of progesterone production. *Biol. Reprod.* 33: 459-469; 1985.

104) MOELJONO M.P., BAZER F.W., W.W. THATCHER. A study of prostaglandin F_{2alfa} as the luteolysin in swine. 1. Effect of prostaglandin F_{2alfa} in histerectomized gilts. *Prostaglandins* 11: 737-743; 1976.

105) MOELJONO M.P., THATCHER W.W., BAZER F.W., FRANK M., OWENS L., C.J. WILCOX. A study of prostaglandin F $_{2alfa}$ as the luteolysin in swine. II. Characterization and comparison of prostaglandin F, estrogens and progestin concentration in utero-ovarian vein plasma of non-pregnant gifts. *Prostaglandins* 14: 543-555; 1977.

106) MONCADA S., PALMER R.M.J., E.A. HIGGS. Nitrix oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Reviews* 42: 109-142; 1991.

107) MURDOCH W.J. Treatment of sheep with prostaglandin F_{2alfa} enhances production of a luteal chemoattractant for eosinophils. *Am. J. Reprod.Immunol.* 15: 52-56; 1987.

108) MURDOCH W.J. Microtubular dynamics in granulosa cells of periovulatory follicles and granulosa-derived (large) lutein cells of sheep: relationships to the steroidogenic folliculoluteal shift and functional luteolysis. *Biol. Reprod.* 54: 1135-1140; 1996.

109) MURDOCH W.J., STEADMAN L.E., E.L. BELDEN. Immunoregulation of luteolysis. *Med. Hypoth.* 27: 197-199; 1988.

110) NAVA G.A., BRIVIO R., BATTOCCHIO M., CAIROLI F., F. SOLDANO. Utilisation du Tiaprost chez la line suivant une insèmination infèfonde. *Cuni Science* 7 : 107-110 ; 1992.

111) NETT T.M., McCLELLAN M.C., G.D. NIESWENDER. Effects of prostaglandinson the ovine corpus luteum: blood flow, secretion of progesterone and morphology. *Biol Reprod* 15:66-78; 1976.

112) NEUFELD G., FERRARA N., SCHWEIGERER L., MITCHELL R., D. GOSPODAROWICZ. Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 121: 597-603; 1987.

113) NEUSCHEFER-RUBE F., PUSCHEL G.P., K. JUNGERMANN. Characterization of PGF_{2alfa}-binding sites on rat hepatocyte plasma membranes. *Eur. J. Biochem.* 211: 163-169; 1993.

114) NISHIZUKA Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science.* 233: 305-312; 1986.

115) NISWENDER G.D., DIEKMAN M.A., NETT T.M. A.M. AKBAR. Relative blood flow to the ovaries of cycling and pregnant ewes. *Biol. Reprod.* 9: 87; 1973.

116) NISWENDER G.D., T.M. NETT. Corpus luteum and its control in infraprimate species. In: *the Physiology of Reproduction*, edited by E. Knobil and J.D. Neill. New York: Raven, 1994, vol. 1, p. 781-816.

117) NOTHNICK W.B., J.L. PATE. Interleukin-1 is a potent stimulator of prostaglandin synthesis in bovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 43: 169-173; 1990.

118) OLOFSSON J., NORJAVAARA E., G. SELSTAM. Synthesis of prostaglandin F_{2alfa}, E_2 and prostacyclin in isolated corpora lutea of adult oseudopregnant rats throughout the luteal life-span. *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids* 46 : 151-161 ; 1992.

119) O'SHEA J.D., NIGHTINGALE M.G., W. A. CHAMLEY. Changes in small blood vessel during cuclical regression in sheep. *Biol. REPROD.* 17: 162-177; 1977.

120) PERKS C.M., DENNING-KENDALL P.A., GILMOUR R.S., D.C. WATHES. Localization of messenger ribonucleic acid for inulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II and type 1 IGF receptor in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 136: 5266-5273 ; 1995.

121) PESCADOR N., SOUMANO K., STOCCO D.M., PRICE C.A., B.D. MURPHY. Steroidogenic acute regulatory protein in bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 55: 485-491; 1996.

122) PHARRIS B.B., CORNETTE J.C., G.D. GUTKNECHT. *J. Reprod. Fertil.* (Suppl.10) 97-103; 1970.

123) PICKLES V.R. Prostaglandins in the human endometrium. *Int. J. Fertil.* 12: 335-338; 1967.

124) PIPER P.J., VANE J.R., J.H. WYLLIE. Inactivation of prostaglandins by the lungs. *Nature* 225: 600-604; 1970.

125) RANI C.S., NORDENSTROM K., NORJAVAARA E., K. AHREN. development of catecholamine responsiveness in granulosa cells from preovulatory rat follicles. Dependence on preovulatory luteinizing hormone surge. *Biol. Reprod.* 28: 1021-1031; 1983.

126) RAY P., C.A. STROTT. Stimulation of steroid synthesis by normal rat adrenocortical cells in response to antimicrotubular agents. *Endocrinology* 103: 1281-1288, 1978.

127) REBOLLAR P.G., UBILLA E., RODRIGUEZ J.M., ILLERA J.C., G. SILVAN. Induction of luteolysis by administration of a synthetic prostaglandin F2alfa analogue in pseudopregnant rabbit. *J. Appl. Rabbit Res.* 15: 456-461; 1992.

128) REDMER D.A., L.P. REYNOLDS. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1: 182-192, 1996.

129) REYNOLDS L.P., KILLILEA S., D.A. REDMER. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J*. 6: 886-892, 1992.

130) RICHARDS J.S., JAHNSEN T., HEDIN L., LIFKA J., RATOOSH S., DURICA J.M., N.B. GOLDRING. Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Prog. Horm. Res.* 43: 231-276, 1987.

131) ROBERTS J.S., L. SHARE. Effect of progesterone and estrogen on blood levels of oxytocin during vaginal distension. *Endocrinology* 93: 1309-1314; 1969.

132) RODGERS R.J., VELLA C.A., YOUNG F.M., TIAN X.C., J.E. FORTUNE. Concentration of cytochrome P-450 cholesterol side-chain cleavage enzyme and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F_{2alfa}-induced luteal regresson in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 1213-1216, 1995.

133) RODGERS R.J., WATERMAN M.R., E.R. SIMPSON. Levels of messenger ribonucleic acid encoding cholesterol side-chain cleavage cytochrome P-450, 17alfa-hydroxilase cytochrome P-450, adrenoxin, and low density lipoprotein receptor in bovine follicle and corpora throught the ovarian cycle. *Mol. Endocrinol.* 1: 274-279, 1987.

134) SAKAMOTO K., EZASHI T, MIWA K., OKUDA-ASHITAKAE, HOUTANI T., SUGIMOTO T., ITOS, O. HAYASHI. Molecular cloning and exoression of cDNA of the bovine prostaglandin F_{2alfa} receptor. *J. Biol. Chem.* 269: 3881- 3886; 1994.

135) SAWYER H.R., ABEL J., McCLELLANM.C., SCHMITZ M., G.D. NISWENDER. Secretory granules and progesterone secretion by ovine corpora lutea in vitro. *Endocrinology* 104: 476-486, 1979.

136) SAWYER H.R., MOELLER C.L., G.P. KOLOWSKY. Immunocytochemical localization of neuroohysin and oxytocin in ovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 34: 543-548; 1986.

137) SAWYER H.R., NISWENDER K.D., BRADEN T.D., G.D. NISWENDER. Nuclear changes in

ovine luteal cells in response to PGF2alfa. *Dom. Anim. Endocrinol.* 7: 229-238; 1990.

138) SCARAMUZZI R.J., D.T. BAIRD. The oestrus cycle of the ewe after active immunization against PGF2alfa. *J Reprod Fertil* 46:39-47; 1976.

139) SILAVIN S.L., MOSS G.E., G.D. NISWENDER. Regulation of steroidogenesis in the ovine corpus luteum. *Steroids* 36: 229-241; 1976.

140) SILVIA W.J., FITZ T.A., MAYAN M.H., G.D. NISWENDER. Cellular and molecular mechanisms involved in lutelysis and maternal recognition of pregnancy in the ewe. *Anim Reprod Sci* 7: 57-74; 1984.

141) SHERWOOD O.D., E.M. O'BYRNE .Purification and characterizationo of porcine relaxin. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 185-196; 1974.

142) SMITH C.J., R. SRIDAN. Time-dependent biphasic effect of cytochalasin D on luteal progesterone release in the pregnant rat. *Life Sci.* 48: 1217-1225; 1991.

143) SMITH G.W., GENTRY P.C., ROBERTS R.M., M.F. SMITH. Ontogeny and regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid within the ovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 54: 76-83; 1996.

144) SOSA A., ORTEGE-CORONA B., CHARGOY J., A. ROSADO. Presence and importance of biogenic amines in reproductive tract secretions. *Fertil. Steril.* 33: 235; 1980.

145) SQUIRES E.L., WENTWORTH B.C., O.J. GINTHER. Progesterone concentration in blood of mare during the estrous cycle, pregnancy and after hysterctomy. *J Anim Sci* 39: 759-767;1975.

146) STEVENS V.L., XU T., J.D. LAMBETH. Cholesterol trafficking in steroidogenic cells: reversible cycloheximide-dependent accumulation of cholesterol in a presteroidogenic pool. *Eur. J. Biochem.* 216: 557-563; 1993.

147) STONE D., O. HECHTER. Studies on ACTH action in perfused bovine adrenals: site of action of ACTH on corticosteroidogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 51: 457-469; 1954.

148) STRADAIOLI G., MONACI M., VERINI SUPPLIZI A., CANALI C., VACCA C. BOITI C. Recovery rate and embryo quality in New Zealand White (NZW) rabbits treated with PMSG and PGF2a. 9th Scientific Meeting of the European Embryo Tranfer Association. Lyon 10-11 settembre 1993, 283.

149) SWANN R.T., N.W. BRUCE. Oxygen consumption, carbon dioxide production and progestagen secretion in the intact rat ovary of the day-16 pregnant rat. *J. Reprod. Fertil.* 80: 599-605; 1987.

150) SUH D.Y., HUNT T.K., E.M. SPENCER. Insulin-like growth factor-1 reverses the impairment of wound healing induced by corticosteroids in rats. *Endocrinology* 131: 2399-2403; 1992.

151) TANDESKI T.R., JUENGEL J.L., NETT T.M., G.D. NISWENDER. Regulation of messenger RNA encoding low density lipoprotein receptor and high density lipoprotein binding protein in ovine corpora lutea. *Reprod. Fertil. Dev.* 8: 1107-1114; 1996.

152) TJAN X.C., BERNDTSON A.K., J.E. FORTUNE. Changes in levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome P-450 side-chain cleavage and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase during prostaglandin F_{2alfa}- induced luteolysis in cattle. *Biol. Reprod.* 50: 349-356; 1994.

153) M. THEAU-CLÉMENT, C. CASTELLINI, L. MAERTENS AND C. BOITI Biostimulations applied to rabbit reproduction : theory and practice World Rabbit Science, 6: 179-184, 1998.

154) TSAI S.J., JUENGEL J.L. M.C. WILTBANK. Hormonal regulation of monocyte chemoattractant protein-1 messenger ribonucleic acid expression in corpora lutea. *Endocrinology* 138: 4517-4520; 1997.

155) TSAI S.J., M.C. WILTBANK. Prostaglandin F_{2alfa} induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum: a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biol. Reprod.* 57: 1016-1022; 1997.

156) TSAI S.J., M.C. WILTBANK. Prostaglandin F_{2alfa} regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biol. Reprod.* 58: 346-352; 1998.

157) TSCHESHE H., FEDROWITZ J., MICHAELIS J., H.W. MACARTNEY. Matrix degrading proteinases from human granulocytes: type I, II, III collagenase, gelatinase and type IV collagenase. *Folia Histochem. Cytobiol.* 61: 269-273; 1986.

158) WANG X., LIU S., EIMERL S., TIMBERG R., WEISS A.H., ORLY J., D.M. STOCCO. Effect of truncated forms of steroidogenic acute regulatory protein on intramitochondrial cholesterol transfer. *Endocrinology* 139: 3903-3912; 1998.

159) WAKELING A.E., L.R. GREEN. Corpus luteum prostaglandin receptors and luteolysis. *Acta vet. Scand. Suppl.* 77: 131-142; 1981.

160) WATERMAN M.R. A rising StAR: an essential role in cholesterol transport. *Science* 267: 1780-1781; 1995.

161) WATHES D.C. Possible actions of gonadal oxytocin and vasopressin. *J. Reprod. Fertil.* 71: 315-345; 1984.

162) WATHES D.C., R.W. SWANN. Is oxytocin an ovarian hormone? *Nature.* 279: 225-227; 1982.

163) WEISS G. Human relaxin: source and stimolus. In: Neil J.D., Bryant- Greenwood G.D., eds. *Relaxin.* Elsevie North- Holland: 167-168; 1981.

164) WILLIAMS M.T., J.M. MARSH. Cytochalasin B inhibition of luteinizing hormone action on bovine luteal cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 112: 549-554, 1979.

165) WILTBANK J.N., L.E. CASIDA. Alteration of ovaria activity by hysterectomy. *J. Anim. Sci*. 15: 134-140; 1956.

166) WILTBANK M.C., DISKIN M.G., FLORESS J.A., G.D. NISWENDER. Regulation of the corpus luteum by protein kinase C. II. Inhibition of lipoprotein-stimulated steroidogenesis by prostaglandin F_{2alfa}. *Biol. Reprod.* 42: 239-245, 1990.

167) WILTBANK M.C., DISKIN M.C., G.D. NISWENDER. Differential action of second messenger system in the corpus luteum. *J. Reprod. Fertil.* suppl 43; 65-75; 1991.

168) WILTBANK M.C., GUTHRIE P.B., MATTSON M.P., KATER S.B., G.D. NISWENDER. Hormonal regulation of free intracellular calcium concentration in small and large ovine luteal cells. *Biol. Reprod.* 41: 771-778; 1989.

169) WOLF R., MEIER-FLEITMANN A., DUKER E.M., W. WUTTKE. intraovarian secretion of catecholamines, oxytocin, beta-endorphin, and gamma-amino butyric acid in freely moving rats: development of a push-pull tubing method. *Biol. Reprod.* 35: 599-607; 1992.

170) YUH K-C.M., BILL C. II, P.L. KEYES. Transient development and function of rabbit corpora lutea after hypophysectomy. *Am J Physiol* 247: 808-814; 1984.

PATOLOGIE DELL'APPARATO RIPRODUTTORE FEMMINILE ED EFFETTI SULLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE

ALESSANDRO FIORETTI* , ANNA CERRONE**

*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Sezione di Patologia Aviare
Facoltà di Medicina Veterinaria – Università di Napoli Federico II
** Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno – Portici, Napoli

L'allevamento cunicolo è caratterizzato dalla costante ripetizione di fasi ed interventi che seguono un programma preordinato ed ogni singolo intervento, mirato allo sfruttamento zootecnico dell'animale, costituisce un fattore di stress e predisponente di stati di malattia. In questo senso un classico esempio di patologia multifattoriale condizionata è rappresentato dai disturbi riproduttivi (FELICIANI, A. 1980, ROSELL J.M. 2000).

Le fattrici rappresentano la categoria commerciale più importante in ogni allevamento intensivo al punto che una prematura riduzione della loro capacità riproduttiva si ripercuote sulla produzione con un notevole impatto economico. Molti sono i fattori che possono essere chiamati in causa nel determinismo delle diverse forme di ipo- infertilità, e tra questi le cause infettive (PATTON N. M., 1992, KPODEKON M. *et al*, 1999).

E' infatti noto che il ritmo di sfruttamento riproduttivo influisce positivamente o negativamente sulla percentuale di scarto e/o mortalità delle fattrici, sulla loro fertilità e prolificità, sul peso che i lattanti raggiungono all'atto dello svezzamento ecc. Inoltre nel quadro della riproduzione cunicola in cattività l'allevatore ha un ruolo importante e sicuramente maggiore rispetto a quello esercitato nei confronti di altri animali domestici. Sono numerosi gli esperti che ritengono come siano le coniglie le principali attrici del processo riproduttivo, costituendo il substrato di studio per una maggiore e più approfondita conoscenza degli aspetti igienico-sanitari della sfera riproduttiva (FELICIANI, A. 1980, ROSELL J.M. 2000). Tuttavia è corretto non sottovalutare i problemi riproduttivi del maschio ed in specie quelli collegati alla sterilità di quest'ultimo. Stabilito quindi che il rendimento tecnico ed economico di un allevamento cunicolo intensivo si misura in gran parte dal numero di coniglietti lattanti che arrivano allo svezzamento, si deve sottolineare che le fattrici riducono il loro rendimento allorché si ammalano, in questo senso ogni tipo di sindrome (dall'otoacariasi alle enteropatie) si ripercuote indirettamente sul regolare andamento del processo riproduttivo, inducendo fenomeni di lieve entità (mancata accettazione del maschio), di media gravità (aborto ad esempio a seguito di disturbi enterici) o di notevole pericolosità (morte della gestante a termine a causa di polmonite). Esistono, però, anche processi patologici che interessano in modo specifico gli organi dell'apparato genitale, spesso sostenuti da fattori ambientali e manageriali (condizioni di utilizzo e mantenimento delle fattrici) e da agenti eziologici sia di natura batterica che virale. Per ciò che concerne questi ultimi si è soliti distinguere le affezioni aspecifiche da quelle specifiche, ascrivendo alle prime le infezioni sostenute da *Pasteurella*, *Stafilococco*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, etc. ed alle seconde quelle che vedono quali agenti eziologici coinvolti *Salmonella*, *Listeria*, *Chlamydia*, *Toxoplasma*, virus della Mixomatosi ed altri.

Considerando a questo punto la classificazione delle affezioni che si andranno a delineare, si deve premettere che in ambito cunicolo ogni schematizzazione delle patologie che si basi su uno dei vari fattori che concorrono al loro determinismo, diviene arbitraria e riduttiva, pertanto appare sempre molto efficace la classificazione cronologica dei fenomeni morbosi che si presentano in allevamento e la relativa evidenziazione delle fasi e dei momenti critici di rischio patologico. In questo senso si ottiene un quadro d'insieme che permette di collegare efficacemente l'insorgenza delle singole patologie alle varie fasi produttive e quindi anche di attuare le giuste misure di profilassi e controllo (FACCHIN E. *et al*., 1993).

FASI E MOMENTI CRITICI PER L'INSORGENZA DEI QUADRI PATOLOGICI

I momenti in cui è maggiore il rischio di insorgenza di malattie a carico dell' apparato riproduttore sono: l'accoppiamento, la vita intrauterina e quella extrauterina.

Accoppiamento

- Le turbe dell'accoppiamento vengono genericamente rubricate nei termini di *sterilità*, ovvero assenza di gestazione in seguito a monta o inseminazione, e di *sub-fecondità*, cioè la diminuzione del numero dei nati per unità di tempo (includendo così i fattori fertilità e prolificità allo tesso tempo).

Vita Intrauterina

- *Inizio Gravidanza*: Intorno al 7 – 8° giorno post-inseminazione avviene l'impianto dell'ovulo in utero e si possono determinare riassorbimenti embrionari. Fra il 12 ed il 13° giorno post-inseminazione avviene l'impianto della placenta fetale ed anche in questa fase è possibile avere riassorbimenti degli embrioni. In media questi fenomeni si realizzano in condizioni di allevamento per un massimo del 28% delle gravidanze totali.
- *Fine Gravidanza*: La differenza media del 7% circa, osservata fra coniglie risultate gravide al test di palpazione e quelle che partoriscono regolarmente, è dovuta a fattori diversi: errori nella palpazione, aborti, mortalità delle fattrici, distocie, natimortalità ed abbandono dei piccoli. Si deve altresì ricordare che il 35% circa delle coniglie riproduttrici viene a morte nella fase finale della gravidanza, identificandosi così questo momento come particolarmente critico. Anche per queste perdite concorrono numerosi fattori, fra loro interagenti, di natura manageriale, infettiva, alimentare e tossica.

Vita Extrauterina

- *Parto e Periodo Perinatale*: dal 1 al 6° giorno di vita è possibile osservare un'elevata percentuale di mortalità fra i coniglietti (5 – 8% in media) legata a carenze ambientali e/o errori manageriali che inducono l'abbandono del nido, lo schiacciamento dei piccoli, la denutrizione dei neonati, la morte per raffreddamento ecc. Le malattie infettive, invece, sono molto rare in questa fase, anche in considerazione della durata della incubazione necessaria per una loro piena manifestazione sul piano clinico.
- *Periodo dell'Allattamento*: La massima produzione lattea della fattrice si realizza fra il 7° ed il 21° giorno di vita dei coniglietti che in questo periodo dipendono totalmente dalla madre. Le perdite che si è soliti registrare in questo momento (in media il 2 – 4%) possono essere messe in relazione ad agenti trasmessi dalla madre (*E.coli, Stafilococchi, Pasteurella multocida*).

STERILITÀ

Nel coniglio, in entrambi i sessi, la sterilità può presentarsi in forma congenita ed acquisita, e può essere conseguente al rifiuto dell'accoppiamento, o il risultato di mancata gestazione dopo una regolare monta od inseminazione.

Le forme acquisite sono da rapportare a fattori di duplice ordine:

- **Condizioni di utilizzazione e di allevamento della fattrice**: in particolare l'età della prima monta, la scelta del ritmo riproduttivo ed il parziale antagonismo fra fase di lattazione

e fase riproduttiva (RENAULT L., 1989; GARDI C., 1992). Con l'avvento della inseminazione strumentale è diventato necessario applicare dei protocolli farmacologici che permettano di sincronizzare gli estri delle fattrici al fine di consentirne l'accoppiamento in gruppi. Protocolli ormonali, con inoculazione di PMSG (10 – 20 UI), sono impiegati anche in caso di inseminazione artificiale in quella categoria di riproduttrici note come "pluripare di ritorno" che sono cioè state inseminate ma non risultano gravide. Tuttavia molti ricercatori hanno da tempo indicato il pericolo di un uso indiscriminato del PMSG, molecola che può indurre la formazione di anticorpi in soggetti trattati più volte, con il risultato di annullare la loro ricettività al trattamento con questa gonadotropina. A questo fine sono stati sperimentati da numerosi AA protocolli ormonali alternativi impiegando con buoni risultati, associazioni PMSG – alfaprostol, determinando un aumento significativo della fertilità e del numero di nati vivi per inseminazione (GRILLI G., 1999; FACCHIN E. *et al.*, 1998). La mancata accettazione del maschio rappresenta la prima manifestazione della sterilità (ROSELL J.M, 2000), tuttavia si deve distinguere fra le condizioni transitorie, della durata di alcuni giorni (al massimo una settimana), che hanno importanza trascurabile, e quelle invece permanenti, ovvero quando un buon numero di multipare per varie settimane non accettano la monta. Quest'ultima condizione è da correlare molto di frequente a disturbi neuroendocrini, che però vengono determinanti in risposta a cause esterne, quali caratteri individuali dell'animale, relazione fra peso e ipofertilità (BRUN J.M. e POUJARDIEU B., 1986), problemi alimentari, condizioni ambientali (temperature elevate, scarsa illuminazione o intensità insufficiente della stessa), influenza nefasta di trattamenti con sulfamidici ed antibiotici (RENAULT L., 1989; AA.VV., 1995). Molti fattori possono ancora influenzare la fertilità delle fattrici, ad esempio, la capacità personale dell'operatore nelle operazioni relative all'inseminazione, l'alimentazione (tasso proteico della dieta; disponibilità di alcuni aminoacidi), anche le intossicazioni possono interferire negativamente con la fertilità. Infine fattori ambientali legati al microclima e la selezione genetica sono ugualmente elementi tutt'altro che trascurabili nel quadro delle problematiche di sterilità della coniglia.

- **Stato di salute dell'animale:** nella maggior parte dei casi le infezioni che si realizzano a carico di ovaio, salpingi ed utero sono localizzazioni secondarie di affezioni microbiche generali, per cui siamo soliti riscontrare patologie sostenute da microrganismi non specifici. A quest'ultimo gruppo appartengono la *Pasteurella multocida*, solitamente causa di aborti, e lo *Staphylococcus aureus*, causa di mastiti. In vari studi epidemiologici volti alla messa in evidenza delle percentuali di isolamento dei diversi germi in fattrici sterili, si è potuto verificare come *Pasteurella multocida* risulta percentualmente più frequente, seguita da *Staphylococcus aureus* e, con valori percentuali significativamente più contenuti, lo *Steptococcus pyogenes*, l'*Escherichia coli* e la *Salmonella typhimurium* (RENAULT L., 1989). Le affezioni specifiche di tipo batterico da collegare alla sterilità sono quelle sostenute dalla *Listeria monocitogenes* e dalla *Salmonella* spp., che determina sempre un aumento delle ripresentazioni al maschio, generalmente dopo un parto caratterizzato da natimoratilità nella nidiata pari o superiore al 50% dei coniglietti. Tra le cause specifiche va incluso anche il virus della Mixomatosi, soprattutto per le lesioni a livello di genitali esterni, le infrequenti infezioni da *Chlamydia psittaci* che possono provocare rifiuto dell'accoppiamento da parte della fattrice, il *Treponema paraluiscuniculi*, responsabile della sifilide del coniglio maschio, ha un'incidenza molto rara nell'allevamento intensivo e nella femmina può indurre metrite e piometra.

Una ulteriore causa di sterilità nella coniglia riproduttrice è legata alla presenza di alterazioni patologiche a carico dell'ovaio. Il processo patologico più comune è la presenza di follicoli cistici non ovulati (GARCIA XIMÈNEZ F. e VICENTE J.S., 1992) il cui trattamento prevede l'impiego dell'HCG. Altra anomalia è quella del corpo luteo persistente, colpisce

particolarmente le pluripare. Più frequente è invece il reperto di cisti paraovariche che si sviluppano a livello di infundibulo, in genere non sembrano interferire con il meccanismo riproduttivo normale.

MORTALITÀ EMBRIONALE, RIASSORBIMENTO E ABORTO

I fattori di maggiore importanza favorenti la **mortalità embrionale e il riassorbimento** sono rappresentati dalla elevata temperatura (oltre i 30°C), da una inadeguata alimentazione, da un eccessivo ingrassamento della fattrice, da carenze vitaminiche. Altri AA sottolineano l'importanza dello stress, in modo particolare la mancanza di tranquillità, ed eventuali interventi vaccinali compiuti a fine gestazione (AA. VV., 1995). Vengono inoltre segnalate correlazioni significative fra riassorbimento embrionale e monta post-partum per effetto della concomitante lattazione (ROSELL J.M., 2000). Il termine riassorbimento fetale indica la mancata nascita di una nidiata a seguito di una palpazione positiva. Sovente è un meccanismo fisiologico proprio dei mammiferi multipari per il quale nell'evenienza che le unità fetoplacentari siano inferiori ad un limite minimo (che nel coniglio è pari a 2–3), queste risultano incapaci di inibire il complesso fenomeno della luteolisi (attraverso una mancata inibizione della secrezione di $PGF_2\alpha$) e quindi determinano l'interruzione della gestazione prima del 21° giorno ed il conseguente riassorbimento fetale. Qualora questo meccanismo non operi adeguatamente è possibile riscontrare ritardi nel parto, ritenzione fetale, presenza nel nido di feti morti con manifestazioni traumatiche, talvolta a questi fenomeni si accompagna prolasso uterino. Situazioni patologiche collegabili al meccanismo fisiologico prima ricordato sono anche parti intraddominali dovuti a lacerazione uterina cui consegue la morte della fattrice. Alcuni fenomeni di riassorbimento fetale sono collegabili sia a cause di ordine genetico che patologico (Chlamydiosi).

Con il termine **aborto** si intende l'espulsione di feti morti o vivi, comunque disvitali, durante una qualunque delle fasi della gestazione (ROBERTS S.J., 1986). Nel coniglio si realizzano con maggiore frequenza negli ultimi 10 giorni di gestazione (in particolare fra il 18° ed il 21° giorno), prima del 30° giorno di gravidanza, in modo particolare nelle primipare. I nati oltre questa data, ma prima del normale termine fisiologico, sono considerati prematuri (destinati comunque a morte per impossibilità a venir adeguatamente curati). Gli aborti possono essere frutto di situazioni casuali (spaventi, manipolazioni brusche), o essere indotti da cause alimentari (basso tenore proteico della razione, carenze di vitamina A e K, entrambe importanti per il corretto sviluppo dell'endometrio e della placenta e per la prevenzione dei fenomeni emorragici), da eccessi nella somministrazione di antibiotici ed anche dalla eventuale ingestione di micotossine od altri fenomeni di tossicosi.

Tuttavia l'aborto è molto spesso determinato da infezioni sia specifiche che aspecifiche, provocate da agenti abortigeni che raggiungono l'utero per via ematica (BONDURANT R.H., 1991). Ciò provoca generalmente la morte dei feti alcuni giorni prima della loro espulsione.

Nel novero delle affezioni aspecifiche bisogna ricordare per prime le infezioni da *Pasteurella multocida*. In presenza di questo germe nella maggior parte dei casi si è riscontrato che i soggetti interessati da forme respiratorie od in preda a setticemie, sono, al contempo, colpiti da problematiche riproduttive. Sebbene la *Pasteurella multocida* sia il germe più frequentemente implicato in problematiche delle vie genitali, esistono molti altri batteri in grado di indurre lesioni purulente e necrotiche alle tube ed all'utero, quali lo *Staphylococcus aureus*, lo *Streptococcus spp*., *l'E.coli* ed il *Cornybacterium pyogenes*, molto rari sono i

miceti, talvolta si osservano infezioni sostenute da *Aspegillus fumigatus*, generalmente ascendenti provenenti cioè dalla via vaginale. Anche la Mixomatosi causa aborto soprattutto per le localizzazioni di lesioni alle mucose dei genitali esterni, ma anche per il notevole rialzo febbrile che solitamente accompagna l'esordio della malattia. Infine anche in corso di affezioni che interessano altri distretti organici, si può verificare l'aborto, basti pensare all'incidenza di questo fenomeno in casi gravi di enterite e nefropatia.

Nel quadro delle infezioni specifiche che inducono aborto si devono ricordare la *Salmonellosi*, la *Listeriosi* e la *Toxoplasmosi*.

AFFEZIONI ASPECIFICHE: PASTEURELLOSI

Negli allevamenti convenzionali la principale forma patologica responsabile di perdite tra i riproduttori, sia quale causa di morte che di riforma, è la Pasteurellosi. La Pasteurellosi è una delle più comuni e gravi malattie batteriche del coniglio, sia in allevamenti convenzionali che di laboratorio (KPODEKON M. *et al*, 1999).

La malattia si esprime sotto diverse forme, la principale è quella respiratoria, caratterizzata da diversi livelli di gravità: dalla rinite, la più comune, alla c.d. polmonite enzootica. Possono inoltre essere attribuite a *Pasteurella multocida* la comparsa di ascessi, torcicollo, metrite, orchite e alcune forme di mastite (PATTON N. M., 1992).

Quasi tutti i conigli sono portatori di *Pasteurella multocida*. La malattia, spesso a carattere acuto, si manifesta quando le condizioni ambientali (concentrazione di ammoniaca, velocità dell'aria) divengono sfavorevoli, generalmente quando l'effetto di questi fattori si attenua o scompare si osserva una certa remissione della malattia, la quale può successivamente ripresentarsi nella stessa forma o con quadri differenti.

Gli *aspetti epidemiologici* di questa malattia variano con le condizioni di allevamento (piccoli allevamenti, stabulari, allevamenti intensivi). Negli allevamenti intensivi la principale fonte di infezione è rappresentata proprio dagli stessi animali c.d. portatori sani. Le femmine riproduttrici rappresentano una costante riserva di *Pasteurella* all'interno dell'allevamento di origine e una importante fonte di infezione in quelli di destinazione nel corso delle operazioni commerciali.

La trasmissione per via aerogena dalla madre ai piccoli non ha un ruolo prioritario, infatti i coniglietti si infettano essenzialmente attraverso il contatto diretto con le loro stesse madri alla fine dello svezzamento. La resistenza "naturale" dei coniglietti prima dello svezzamento è dimostrata. In effetti, quando le condizioni ambientali generali sono buone i coniglietti restano indenni da *Pasteurella* fino all'età di 21-25 giorni, anche se la madre è una portatrice sana. Non si tratta solamente di immunità passiva trasmessa attraverso il latte materno in quanto tutte le prove di inoculazione sperimentale realizzate con coniglietti nati da madri SPF sono stati infruttuosi. Tuttavia il rischio di contaminazione naturale dei coniglietti è lo stesso negli allevamenti in cui la *Pasteurella* è di fatto endemica.

Un altro importante momento durante il quale la femmina può trasmettere il patogeno è alla fine della gestazione, quando le profonde modificazioni fisiologiche provocano una immunodepressione della durata di qualche giorno che può favorire l'esteriorizzarsi di fenomeni patologici preesistenti, tra cui le affezioni respiratorie.

Con il tempo, le gestazioni successive sottopongono a grande lavoro l'utero e dopo l'8ª – 9ª gestazione questi soggetti possono divenire portatori cronici di *Pasteurella multocida*.

Anche il materiale impiegato per l'inseminazione artificiale può rappresentare un importante fonte di infezione della vagina. Considerando la conformazione anatomica di questo

organo, la pipetta di inseminazione può introdurre in profondità il germe e, se maneggiata scorrettamente, ledere la mucosa. Si stima che dal 30% al 60% degli insuccessi delle inseminazioni possono essere dovuti, in allevamenti in cui non è adeguata l'igiene degli strumenti e improprie le manualità, ad una vaginite e successiva metrite anche se verificatasi nel corso di una gestazione precedente. Anche la manipolazione dei riproduttori in serie finalizzata alla diagnosi di gravidanza può rappresentare un importante momento di diffusione della malattia in presenza di mastite. Il rischio è tanto maggiore quanto più vicino è il momento in cui la femmina raggiunge il picco di lattazione (KPODEKON M. *et al*, 1999).

In tutte le forme di pasteurellosi si ha un indebolimento della fattrice che può provocare un calo notevole delle *performance* riproduttive. In particolare in corso di pasteurellosi la perdita di peso può essere grave e quanto più si riduce il peso della fattrice tanto maggiore è il rischio di una riduzione della fecondità, della comparsa di aborti, della nascita di nidiate poco vitali (PATTON N. M., 1992).

Da un *punto di vista clinico* le infezioni a carico dell'apparato riproduttore si esprimono con una metrite suppurativa che spesso evolve in piometra. Generalmente le femmine gravide non abortiscono ma si assiste ad una lisi embrionaria. Queste metriti portano alla sterilità della femmina o alla sua morte conseguenza di una intossicazione o setticopiemia. Quanto alle mastiti di origine pasteurellare, si è visto che la loro frequenza è divenuta superiore a quelle di origine stafilococcica, analogamente a quanto è accaduto per ciò che concerne gli ascessi sottocutanei.

Le *lesioni macroscopiche* si caratterizzano per la presenza di un pus biancastro nell'utero, mentre l'endometrio appare spesso congesto. La metrite si associa sovente a vaginite, salpingite e peritonite. La ghiandola mammaria presenta i segni della infiammazione parenchimatosa che può evolvere fino alla formazione di ascessi. Microscopicamente gli organi colpiti si presentano con una infiltrazione di cellule infiammatorie (granulociti) associate a qualche linfocita e plasmocita, immagine caratteristica di una infiammazione suppurativa.

La pasteurellosi è teoricamente una malattia intrattabile, sebbene le pasteurelle siano sensibili a numerose molecole *in vitro*. Se un trattamento deve essere intrapreso la via parenterale è la più indicata e il trattamento deve essere applicato per lungo tempo e a posologia elevata (KPODEKON M. *et al*, 1999).

Attualmente non esistono vaccini in grado di consentire una adeguata protezione degli animali. Ciò è sicuramente legato anche al fatto che in uno stesso allevamento possono essere, in periodi differenti, repertati ceppi batterici diversi. Tale aspetto potrebbe essere sfruttato per l'ottenimento di autovaccini prodotti con un gruppo di ceppi rappresentanti tutti i differenti *clusters* inizialmente presenti nell'allevamento (BADIOLA-SAIZ J. I. *et al,* 1996).

I migliori risultati di vaccinazione possono essere ottenuti vaccinando per la prima volta gli animali all'età di 5-6 settimane, in assenza di trattamenti antibiotici concomitanti. Due richiami sono necessari ad intervalli da 4 a 5 settimane. In questo modo l'ultimo richiamo verrà effettuato poco prima della messa in riproduzione della giovane femmina (KPODEKON M. *et al*, 1999).

AFFEZIONI SPECIFICHE: *SALMONELLOSI, LISTERIOSI, CHLAMYDIOSI, TOXOPLASMOSI E MYXOMATOSI*

La Salmonellosi è un'infezione provocata da Enterobatteri del genere Salmonella fra le più importanti sia nel campo della medicina umana che in quella veterinaria, determinando costi sociali notevoli sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo.

Nel coniglio questa patologia venne descritta nel 1928 per la prima volta da Olney, le segnalazioni più frequenti riguardano il periodo precedente all'avvento della coniglicoltura industriale (GAROFANO T., 1936; GUALANDI G., 1948; BIFFI GENTILI G., 1949; CORSICO G., 1960; CORAZZALA S. *et al.*, 1970). Successivamente è stata considerata una patologia sporadica, favorita da particolari condizioni di mancato rispetto delle comuni norme sanitarie (GATTI R. *et al.*, 1988; HARWOOD D.G., 1989; PAPPARELLA V. *et al.*, 1986), tuttavia a partire dal 1993 si è osservato un incremento dell'incidenza di questa infezione negli allevamenti cunicoli, senza un'apparente motivazione (ROSELL J.M., 2000). La *diffusione dell'infezione* negli allevamenti avviene principalmente per via indiretta, attraverso contaminazione ambientale da parte di portatori (roditori e gli uccelli) che infettano acque superficiali e terreni, mentre gli animali si contagiano per via orale (LEBASTARD D. *et al.*, 1995). Anche nell'allevamento cunicolo la gravità dell'infezione viene influenzata dalle condizioni ambientali (ad esempio la qualità del microclima), dalla conduzione igienica e dalla patogenicità dei sierotipi di *Salmonella* implicati (GRILLI G.,1996). Le Salmonelle nella specie cunicola hanno tropismo per l'apparato digerente, per il polmone e l'apparato genitale femminile delle gestanti, inducendo aborto intorno al 23° giorno di gestazione, meno spesso mortalità embrionaria precoce, aumento della natimortalità, mummificazione fetale e, non sempre, sterilità. La morbilità in queste forme a carattere riproduttivo si attesta intorno al 10%, mentre la mortalità, specie fra le gestanti, può giungere sino al 2,5% giornaliero degli animali infetti, arrivando ad interessare il 60% dei giovani e sino al 25 – 30% dei capi adulti, mentre gli aborti sono in ragione del 2% di feti al giorno (ROSELL J. M. , 2000; ZANON F., *et al.*, 1996). La localizzazione agli organi genitali è secondaria alla setticemia, tuttavia le salmonelle colonizzano inizialmente l'intestino, mediante invasione della parte apicale dei villi ove si moltiplicano attivamente, passando ad infettare la lamina propria degli enterociti con richiamo di polimorfonucleati che, effettuata la fagocitosi migrano ai linfonodi regionali da cui poi ha inizio la fase setticemica. Il periodo di incubazione varia dai 3-4 giorni ai 10–12 con un decorso generalmente acuto – subacuto della malattia. Il *sintomo* più costantemente rilevato è la diarrea che però riguarda in modo particolare i soggetti giovani, soprattutto i lattanti (DELONG D. *et al.*, 1994). Nella forma setticemica si osserva febbre, depressione ed inappetenza, mentre in quella genitale si riscontrano aborti e mortinatalità, con presenza occasionale, sia nei soggetti che hanno abortito che nelle fattrici gravide infette, di uno scolo vaginale mucopurulento (FLATT R.E., 1974). Le fattrici possono venire a morte nel giro di 1–2 giorni dall'aborto. Nelle coniglie riproduttrici il *quadro anatomo-patologico* è dominato, oltre che dalle lesioni riscontrabili a livello intestinale ed epatico, da metrite purulenta ed ulcerativa nell'ambito della quale l'utero appare dilatato, con piccole formazioni ascessuali che interessano l'intero spessore della parete, la mucosa si presenta necrotica e/o purulenta, talvolta con ulcere disseminate (GRILLI G., 1996). Sono stati descritti anche casi con vaginite muco purulenta, soprattutto con infezione da *Salmonella typhimurium ceppo DT 49b* (HARVOOD D.G., 1989). Dal punto di vista clinico la *diagnosi* fra i riproduttori deve venir sospettata a partire da un inconsueto aumento degli aborti e dei soggetti che muoiono in fase perinatale, tuttavia va confermata con l'isolamento e l'identificazione del germe. Dal punto di vista sierologico si possono impiegare la sieroagglutinazione rapida e lenta e l'ELISA, tuttavia i test non hanno valore per la diagnosi individuale, ma divengono utili nell'identificazione degli allevamenti infetti. In genere dopo l'aborto si è soliti osservare sieroconversione, ma non è infrequente avere risposte false negative legate a diversi fattori quali: precocità dell'accertamento diagnostico, infezione molto lieve o localizzata al solo intestino in forma transitoria (GRILLI G., 1996). Il miglior sistema per prevenire e controllare la salmonellosi è la corretta gestione igienico sanitaria dell'allevamento: lotta ai roditori, caratteristica *bird- proof* dei capannoni, la verifica con analisi batteriologiche e/o sierologiche dei riproduttori in merito ad un loro eventuale stato di

portatori del germe, in specie nelle aree in cui questa infezione si è presentata in forma enzootica. Molto utili sono l'eliminazione dei soggetti che hanno abortito e che contemporaneamente presentino quadri di diarrea o quelli che generino nidiate che presentano poi fenomeni enterici riconducibili a salmonellosi, le disinfezioni periodiche dopo ogni ciclo nel reparto maternità, il controllo e la potabilizzazione dell'acqua, l'igiene del nido. Ancora a carattere sperimentale, e con risultati controversi, è l'impiego a scopo profilattico della microflora intestinale normale con finalità competitive.

Al fine di migliorare il controllo della malattia nel corso di una infezione da *Salmonella typhimurium* è stato sperimentato in Spagna un autovaccino impiegato nella rimonta e nei riproduttori per circa un anno, con notevole riduzione delle problematiche cliniche e dell'indice di mortalità. Il programma vaccinale da adottare impiegando tali autovaccini, formolati ed adiuvati con idrossido di alluminio, prevede 4 dosi nelle fattrici in produzione con intervalli di 15 giorni fra la prima e la seconda, di 30 fra quest'ultima e la terza ed infine di 60 giorni fra la terza e la quarta. Nella rimonta si impiegano tre dosi ad intervalli di 15 – 20 giorni fra loro. E' necessario prevedere una verifica semestrale degli stipiti circolanti nell'allevamento, assicurandosi così la possibilità di inserire nuove varianti o sierotipi eventualmente isolati (ROSELL J.M., 2000).

Di gran lunga più utilizzata è la terapia antibiotica utile nella riduzione della mortalità, ma non per ottenere l'eradicazione di questo germe. Molti AA raccomandano l'uso dell'enrofloxacin (20 mg/Kg p.v. per un periodo di 7 gg), anche se la somministrazione orale non ha sempre fornito buoni risultati, in particolare nei lattanti (ZANON F. *et al.*, 1996), SACO M. *et al.* (1997) ne consiglia l'impiego in acqua, associandolo all'apramicina e/o a sulfamidici, mentre altri ricercatori hanno proposto l'impiego della gentamicina (6 mg/kg p,v. – DURANTI G. *et al.*, 1993). Tuttavia è sicuramente in aumento il fenomeno dell'antibiotico-resistenza anche fra le Salmonelle in ambito cunicolo (ROSELL J.M., 2000). Si è anche rilevato molto utile l'impiego di coadiuvanti alla terapia antibiotica, rappresentati da elevate concentrazioni di *Streptococcus farcium* e *Lactobacillus acidofilus*, nonché *pool* di acidi (citrico, fumarico ed ortofosforico) che insieme contrastano efficacemente la colonizzazione delle Salmonelle a livello intestinale.

Altra importante affezione specifica del tratto genitale del coniglio è la Listeriosi, dovuta ad un piccolo bacillo Gram +, la *Listeria monocytogenes*, che dimostra tropismo genitale e nervoso, viene considerata una malattia di origine tellurica ed i roditori costituiscono il serbatoio naturale. Venne osservata nel coniglio per la prima volta nel 1924 da MURRAY *et al.* (1926), quindi è stata descritta numerose volte in Europa, ma una sola volta in Italia nel 1965 da CARLOTTO e questa scarsità di riscontri fa ritenere che questa patologia, ancorché poco frequente, sia sottovalutata nel nostro paese. La listeriosi va considerata sia per i suoi risvolti zooeconomici nell'allevamento cunicolo, che per la sua pericolosità per l'uomo sia esso allevatore che consumatore di carni. Nel coniglio la trasmissione avviene principalmente per via orale, infatti per via digerente eventuali disturbi nutritivi e/o modificazioni vasomotorie possono facilitare lo sviluppo del germe in ambito intestinale ed il suo successivo passaggio in circolo con colonizzazione a livello epatico ed encefalico. Tuttavia sono state proposte altre vie di contagio, in condizioni sperimentali quest'ultimo si è ottenuto in coniglie gravide per via congiuntivale (VETÈSI F. e KEMENES F., 1967) ed anche per via auricolare (TRAUB E., 1943), mentre la trasmissione attraverso zecche infette è stata realizzata ed è comune anche ad altri animali (GUALANDI G., 1995).

Dal *punto di vista clinico* si conoscono diverse forme: nervosa (encefalite o meningoencefalite) caratterizzata da incoordinazione motoria e torcicollo, setticemica, tipica dei giovani e genitale, caratterizzata da aborti. La *Listeria monocytogenes* manifesta comunque un notevole tropismo per le vie genitali femminili e nelle fattrici induce una forma localizzata a

livello uterino con essudato vaginale striato di sangue e causa aborto e sterilità, mortinatalità e metrite. L'utero appare ipertrofico e congesto, la placenta e l'endometrio sono in preda ad infiammazione purulenta ed i feti abortiti si presentano decomposti o mummificati (RENAULT L., 1989). Tuttavia sono molti gli AA che insistono sul carattere genitale della listeriosi cunicola rispetto a quello abortigeno, in quanto alcune coniglie presentano patologia uterina non accompagnata da aborto (CIVERA T. e FERRERO E., 1987). Dal *punto di vista necroscopico* si nota a livello di utero una metrite necrotizzante diffusa od a focolai con prevalente interessamento dell'endometrio, ma possono venir anche coinvolti il miometrio e la sierosa peritoneale. Un reperto particolarmente significativo è rappresentato dalla colorazione verdastra che assume il connettivo sottocutaneo e che è legato al turgore dei vasi venosi e deve venir distinto da fatti putrefattivi. La *diagnosi* clinica ed anatomopatologica può essere solo di sospetto in particolare quando si rilevano sintomi neurologici, disturbi della sfera genitale ed aborti, ma la conferma viene dagli esami di laboratorio, quali l'accertamento batteriologico: il campione clinico migliore, in casi interessanti l'apparato riproduttore, sono il feto e l'essudato utero – vaginale. Sono utili anche lo studio dell'attività emolitica, la mobilità e la tipizzazione sierologica, l'immunofluorescenza diretta, che però può determinare anche falsi positivi; prove sierologiche che forniscono spesso risultati di difficile interpretazione (CIVERA T. e FERRERO E., 1987). Infine bisogna menzionare la prova biologica su animali da laboratorio inoculati per varie vie (instillazione congiuntivale nel coniglio o test d'Anton – congiuntivite sieropurulenta acuta e monocitosi dopo 8 – 10 giorni) che vengono a morte a 7 giorni post infezione. Per ciò che concerne la *diagnosi differenziale* delle forme genitali della listeriosi del coniglio si deve tener conto dell'endometrite da *Salmonella* che è a carattere purulento e necrotico – ulcerativa, e quella, sempre di tipo purulento, indotta da *Pasteurella multocida*. In entrambi i casi è l'esame batteriologico l'ausilio diagnostico discriminante. Sul piano della *profilassi* si deve innanzitutto evitare l'ingresso in allevamento di topi e ratti ed in caso di diagnosi di listeriosi viene raccomandata la pratica dell'eliminazione dei soggetti infetti e di quelli sospetti infetti, ciò è particolarmente valido in corso di problematiche genitali, per le quali sono poco attive le *terapie* con antibiotici. Tuttavia la listeria è un germe sensibile a numerosi chemioantibiotici, quali tetracicline, ampicillina, aminoglucosidi ed anche sulfamidici (DURANTI G. *et al.*, 1993), ma per ottenere risultati validi è molto importante attuare queste terapie con la massima tempestività, ovvero nelle prime fasi del processo morboso (GUALANDI G., 1995). Considerata l'importanza prevalente dell'immunità cellulo-mediata (attivazione dei macrofagi) nei meccanismi organici di difesa dal germe, i vaccini inattivati non forniscono validi risultati nella prevenzione dell'infezione. In relazione all'importanza che hanno gli alimenti nella diffusione dell'infezione, è assolutamente necessaria una politica d'igiene dell'acqua, dei foraggi oltre che degli ambienti, il disinfettante di scelta è la formalina (CIVERA T. e FERRERO E., 1987). Sebbene è noto che sono essenzialmente i bovini e gli ovini gli animali più comunemente responsabili di trasmissione della *Listeria monocytogenes* all'uomo, anche il coniglio può venir considerato una potenziale fonte di contagio, in modo peculiare per la categoria degli allevatori (WEISBROTH S.H. *et al.*, 1974). Non esistono segnalazioni di trasmissione dell'infezione dal coniglio all'uomo ed anche la possibilità di trasferire il contagio con le carni appare molto remota, tuttavia il giudizio ispettivo sulle carcasse di animali colpiti da listeriosi è sempre molto severo (CIVERA T. e FERRERO E., 1987). In definitiva tutti gli AA ritengono, però, esenziale l'approfondimento delle conoscenze epidemiologiche in merito alla listeriosi del coniglio, anche per valutare correttamente l'impatto zoonosico dell'infezione.

La Chlamydiosi rappresenta sicuramente un'affezione poco conosciuta e studiata in campo cunicolo. Vi sono segnalazioni in Spagna (BLANCO LOIZELIER A., 1971), Stati Uniti,

Sudafrica ed Italia. Molto rara è la *Chlamydia pneumoniae* nel coniglio, registrandosi ad oggi una sola segnalazione di polmonite interstiziale riconducibile a tale germe in un Angora (KRISHNA L. e GUPTA V.K., 1989). Dal punto di vista epidemiologico il coniglio selvatico rappresenta un serbatoio di infezione per tutte le specie animali, anche grazie a zecche vettrici che possono infestare gli ovicaprini (GALLAZZI D. *et al.*, 1992), tuttavia il coniglio può sieroconvertire anche a seguito di contatto con equini infetti. Le modalità di trasmissione sono però ancora poco conosciute, sono stati chiamati in causa un vasto numero di vettori quali insetti, ectoparassiti ed anche volatili selvatici. Il contagio può avvenire per via aerogena (infezioni respiratorie), colostrale, mentre molto più probabile è la via transplacentare, anche per il tipo di placenta (emocoriale) che fin dalle prime fasi della gravidanza determina una connessione molto stretta fra sangue fetale e materno. Nei maschi l'infezione può provocare orchite, epididimite ed uretrite associata a sintomi respiratori, nella forma sub-clinica i riproduttori possono trasmettere il germe per via seminale (ROSELL J.M., 2000). Dal punto di vista patogenetico si possono distinguere due fasi: la prima si identifica con il periodo di incubazione (3–8 giorni), si può notare rialzo febbrile che coincide con la clamidiemia, cui può seguire anche la morte dell'animale (fase acuta). La seconda coincide con una fase sub–acuta o meglio cronica persistente, nel corso della quale possono comparire i segni clinici per l'intervento di fattori stressanti e favorenti di varia origine e natura.

Il *quadro clinico* si caratterizza per la comparsa di enterite, polmonite, meningoencefalite, congiuntivite, metrite, aborto, infertilità ed aumento della mortalità neonatale. La forma più classica è quella respiratoria, più grave è quella enterica, caratterizzata da elevata mortalità negli svezzati. Relativamente alla sfera genitale si è considerato che la mortalità neonatale non dipende direttamente dalla *Chlamydia* (che non viene mai isolata dai coniglietti), ma da un processo tossico conseguente all'infezione della madre e che induce un'eccessiva attivazione lisosomiale nelle cellule del prodotto del concepimento (GALLAZZI D. *et al.*, 1992). Le forme abortigene possono far registrare anche morbilità eccezionali nelle fattrici in riproduzione (sino al 100%), ma si tratta di forme tardive che intervengono dopo il 20° giorno di gestazione e che in genere non determinano morte della femmina. La localizzazione della Chlamydia è placentare comunque il germe è in grado di latentizzarsi a livello di cellule epiteliali degli organi sessuali, riattivandosi durante la gravidanza. La fattrice colpita, spesso primipara, può presentare inquietudine ed inappetenza, emorragie ante e post partum, aborto o parto a termine con emissione di essudato siero-catarrale filamentoso, successiva riduzione della fertilità o completa infertilità (BURATTO L. e COLIN M.,. 1991). Nei feti a termine e nei casi di mortalità neonatale si riscontra con frequenza idrocefalia che può essere secondaria a forme occlusive od a coroidite, alcuni ricercatori spagnoli hanno verificato numerosi casi di clamidiosi con una generale diminuzione del tasso di parti pari al 20 – 30% ed una notevole frequenza di forme idrocefaliche (PACHECO e SEGOVIA, 1999; cit. da ROSELL J.M., 2000). Dal punto di vista sierologico si può evidenziare che i titoli anticorpali fissanti il complemento persistono per circa 6 mesi con valori fluttuanti, ma anche spesso elevati in particolare nelle coniglie che hanno presentato mortalità neonatale (GALLAZZI D. *et al.*, 1992).

I *metodi diagnostici* elettivi sono quelli basati sull'evidenziazione diretta della Chlamydia (colorazioni specifiche, immunofluorescenza, prove immunoenzimatiche), sulla sua coltivazione su adatti substrati (colture cellulari o uova embrionate) o sulla ricerca degli anticorpi specifici. Grande importanza assume la scelta dei campioni dai quali partire per ottenere l'isolamento del germe, infatti in corso di problematiche genitali si deve utilizzare la placenta oppure il fegato e/o il plesso corioideo del feto, quest'ultimo particolarmente ricco di corpi elementari (ROSELL J.M., 2000).

Per ciò che concerne la *profilassi* è indubbia l'importanza delle misure igienico sanitarie,

della necessità di effettuare un preventivo controllo sierologico specifico su riproduttori che si intende introdurre in allevamento (GALLAZZI D. *et al.*, 1992), dell'attento controllo microbiologico del seme nell'I.A., anche perché gli antibiotici normalmente impiegati nei mezzi di conservazione e diluizione del seme cunicolo non risultano attivi verso *Chlamydia e Mycoplasma* (ROSELL J.M., 2000). In passato è stata proposta da alcuni AA italiani la chemioprofilassi, mediante impiego di tetracicline nei conigli a partire dai giorni immediatamente precedenti allo svezzamento, seguito, nei casi di effettiva necessità del trattamento, anche per via parenterale, di soggetti con infezione in atto o comunque sieropositivi (JULINI M. e FAZIO G., 1985). DURANTI G. *et al.* (1993) hanno invece proposto l'uso del vaccino impiegato negli ovini per prevenire l'aborto clamidiale in ragione di mezza dose, tuttavia sono numerosi gli studiosi che considerano rischiosa tale pratica, in quanto questo presidio, quando impiegato in animali con infezione cronica sub-clinica od in incubazione, può scatenare reazioni immuno-patologiche (anafilassi) anche molto gravi (ROSELL J.M., 2000). Oggi si insiste sul trattamento di elezione con tetracicline in acqua per almeno 7 giorni, mentre nei maschi andrebbe preferita la via parenterale con ossitetraciclina. La clamidiosi cunicola deve venir considerata a tutti gli effetti una zoonosi, anche se ad oggi non risultano segnalazioni di infezioni umane provocate da contatto con conigli infetti.

La Toxoplasmosi è un'infezione parassitaria del sistema reticolo–endoteliale indotta da un protozoo, il *Toxoplasma gondii*, a localizzazione intracellulare e tropismo genitale e nervoso. L'infezione si traduce in dimagramento, anemia, paraplegia ed aumento della natimortalità. Molto tipica come lesione a carico dell'apparato genitale è la metrite necrotica con presenza di feti mummificati, la sua incidenza è scarsa, ma presenta interesse zoonosico. Il coniglio è solito infestarsi con alimenti contaminati da feci di gatto, la *forma clinica* più frequente è quella genitale, accanto a quelle respiratoria (dispnea e corizza) e neurologica (tremori e convulsioni). Le coniglie infette possono abortire o contagiare i feti per via placentare, anche durante parti successivi, i coniglietti che nascono appaiono disvitali e possono presentare idrocefalia. Sono stati segnalati casi di conigli di 65 giorni, infettatisi per via transplacentare, con paraplegia a livello di arti posteriori ed anoressia morti nella quasi totalità (BURATTO L. *et al.*, 1995), oltre a casi molto gravi con indici di mortalità pari al 90%, tremori nel nido e morte entro le 24 h dall'esordio delle manifestazioni cliniche e comunque entro i 3 – 4 giorni di vita. Nel corso della *necroscopia* si riscontra splenomegalia e lieve congestione intestinale nei lattanti, mentre nelle fattrici si evidenziano lesioni a carico dei feti nelle corna uterine (ROSELL J.M., 2000). Dal *punto di vista epidemiologico* si ritiene che la sieropositività verso il *Toxoplasma* sia elevata in ambito cunicolo. Il contagio fra conigli avviene per via transplacentare, la percentuale di natimortalità nel gruppo è del 10 – 13%, a livello di nido è del 20%. Le *diagnosi* clinica e necroscopica non sono sempre facili, potendosi confondere questa parassitosi con forme respiratorie e con la pseudotubercolosi, anche se la splenomegalia è una lesione di riscontro molto costante nella toxoplasmosi, le analisi istologiche e/o sieroimmunologiche vanno eseguite in animali sospetti (ad esempio fattrici che hanno abortito) sacrificati, in quanto i tachizoiti tendono a morire rapidamente. Di recente alcuni AA hanno impiegato l'immunoperossidasi indiretta per il riscontro di agenti di difficile isolamento a partire sia da polmoni che da uteri e tamponi cervicali di conigli con problematiche sanitarie. Si è potuto notare che in questi ultimi campioni del tratto genitale la prevalenza del *Toxoplasma gondii* è pari al 20,4%, collocandosi al quarto posto rispetto ad altre quali *Chlamydia psittaci*, virus della Miexomatosi e *Mycoplasma spp*.(GARCIA E. *et al.,* 2001). La profilassi consiste nell'evitare l'accesso a specie portatrici, ed in particolare ai gatti, l'esclusione delle fattrici sospette e nell'esecuzione di opportune disinfezioni, tenendo conto che le oocisti di toxoplasma mantengono la loro capacità infettante per oltre un anno negli allevamenti. La terapia si basa sull'uso di sulfamidici,

macrolidi e tetracicline, sotto il profilo della salute pubblica l'importanza del coniglio nella trasmissione dell'infezione all'uomo è scarsa, anche se la carne può contenere oocisti (MARCATO P.S., 1989).

In ultimo è opportuno citare, fra le affezioni genitali specifiche in ambito cunicolo, la Mixomatosi. Un aspetto molto importante è quello relativo all'eliminazione di virus infettante della Mixomatosi per via seminale (CASTELLINI C. *et al.*, 1994; SCUOTA S. *et al.*, 1993 e CENCI T. *et al.*, 1996). Animali con sintomi prodromici della malattia (blefarite, congiuntivite, etc.) possono eliminare significative quantità di virus infettante con il seme e quindi trasmettere l'infezione alle femmine sia per via venerea che attraverso l'I.A. Sperimentalmente maschi riproduttori regolarmente vaccinati con eterologo e poi infettati con virus della mixomatosi patogeno, pur non presentando mortalità e solo in alcuni casi una sintomatologia riferibile all'infezione, eliminano lo stipite patogeno per via seminale sino a 50 giorni post infezione (CENCI T. *et al.*, 1996). E' facilmente comprensibile come tale situazione sia un ulteriore importante fattore di rischio nella pratica dell'inseminazione artificiale.

BIBLIOGRAFIA

1) AA.VV. La santé des lapins, ed. *Association Francaise de Cuniculture, Lempdes (France)*, 61 – 65; 1995.

2) BADIOLA-SAIZ J.I., PUJOUL J., PEREZ DE ROZAS A.M., SACO M., ROSELL J.M. Theoretical and practical aspects of the differentation of *Pasteurella multocida* strains through the study of the biochemical kinetics. *6° World Rabbit Congress, Toulouse 1996*, 23-27; 1996.

3) BIFFI GENTILI G. Un'insolita causa di salmonellosi dell'uomo: la carne di coniglio. *Clin. Vet.,* 72, 193-196; 1949.

4) BLANCO LOIZELIER A. (1971) cit. da Rosell J.M., 2000.

5) BONDURANT R.H. (1991) cit. da Rosell J.M., 2000.

6) BRUN J.M., POUJARDIEU B. (1986) cit. da Rosell J.M., 2000.

7) BURATTO L., COLIN M. La chlamydiose chez les lapins reproducteurs. *Cuniculture.* 101, 18(5), 253-254; 1991.

8) BURATTO L. , BURATTO S., BRUSA F. La toxoplasmosi nel coniglio in allevamento intensivo. *Riv. Coniglicoltura.* 4/5, 31-33; 1995.

9) CARLOTTO F. (1965) cit.da Civera T. *et al*, 1987.

10) CASTELLINI C., CENCI T., SCUOTA S., LATTAIOLI P., BATTAGLINI M. La Myxomatose: implications possibles sur la pratique de l'insemination artificielle. *Proc. VI Journées de la Recherche Cunicole, La Rochelle*, 9-15; 1994.

11) CENCI T., SCUOTA S., DAL BOSCO A., DE COSMO A.M., CASTELLINI C. Detection of Myxomatosis virus in the semen of bucks experimentally infected after vaccination with a Shope's Fibroma virus. *Proc.6th World Rabbit Congress*, *Toulouse* 1996, vol. 3, 47-49; 1996.

12) CIVERA T., FERRERO E. Una malattia ancora poco conosciuta: la Listeriosi del coniglio. *Riv. Coniglicoltura*, 9, 31-35; 1987.

13) CORAZZALA S., ZANIN E., BERSANI G. (1971) cit. da Grilli G. *et al* 1996.

14) CORSICO G. (1960) cit. da Grilli G. *et al*, 1996.

15) DELONG D., MANNING P.J. (1994) cit. da Rosell J.M., 2000.

16) DURANTI G., MONDINI S., DURANTI A. Le malattie del coniglio. Patologia, profilassi e terapia. ed. *Edagricole*, Bologna; 1993.

17) FACCHIN E., CASTELLINI C., CAPPIOTTI P. Dispensa di Coniglicoltura. ed. *Lapival srl En. A.I.P. Veneto*, Ist. Zooprofilattico Venezie, Sez.Verona, Verona; 1993.

18) FACCHIN E., ZANON F., FIORETTI A., GALLAZZI D. Aspetti igienico sanitari della filiera cunicola. *Riv. Coniglicoltura*, XXXIII, 4/5, 51-54; 1996.

19) FELICIANI A. Il problema dell'infertilità negli allevamenti cunicoli. *Riv. Coniglicoltura*, XVII, (10), 29-30; 1980.

20) FLATT R.E. (1974) cit. Da Grilli *et al*, 1996.

21) GALLAZZI D. ORSENIGO R., GRILLI G., BRIVIO R., SALA V., GULLO E. Indagine sierologica per Chlamydia psittaci nel coniglio. *Riv. Coniglicotura*, XXIX (10), 43-46; 1992.

22) GARCIA XIMÉNEZ F. Y VICENTE J.S. (1992) cit. da Rosell J.M., 2000.

23) GARDI C. I fattori che influenzano la riproduzione. *Riv. Coniglicoltura*, 1, 31-33; 1992.

24) GAROFANO T. (1936) cit. da Grilli *et al*, 1996.

25) GATTI R., NIGRELLI A.D., CONSADORI G. CORRADINI C.E., DEROSSI L. (1988) cit. da Grilli *et al*, 1996.

26) GRACIA E., VILLA A., FERNANDÉZ A., ALBIZU I., BASELGA R. Respiratory and reproductive pathology in rabbits farms: prevalence of pathogens in lungs and uterus by immunocytochemistry. *7th World Rabbit Congress, Valencia, Espana*, vol., 249-253; 2001.

27) GRILLI G., ORSENIGO R. GALLAZZI D. La salmonellosi del coniglio. *Riv. Coniglicoltura*, XXXIII, (1/2), 29-33; 1996.

28) GUALANDI G. (1948) cit. da Grilli G *et al*, 1996.

29) GUALANDI G. Listeria. in Farina R. e Scatozza F. (eds) *Trattato di Malattie Infettive degli Animali.* 319-326, UTET , Torino; 1995.

30) HARVOOD D.G. Salmonella typhimurium infection in a commercial rabbitry. *Vet. Rec*., 125, 554-555; 1989.

31) JULINI M., FAZIO G. La Chlamydiosi del coniglio. *Riv. Coniglicoltura*, XXII (6), 29-32; 1985.

32) KRISHNA L.E., GUPTA V.K. Chlamydial pneumonia in Angora rabbits. A case report. *J. Appl. Rabbit Res.*, 12 (2), 83; 1989.

33) KPODEKON M., RIDEAU P., COUDERT P. (1999) "Pasteurelloses du lapin: revue" *Rev. Med. Vet.*, 150, 3, 221-232;

34) LEBASTARD D., MORISSET M.C., MICHEL F. RUBILARD P., DUPONT P. (1995) cit. Da Grilli G. *et al*, 1996.

35) MARCATO P.S. Les affections nerveuses chez le lapin. in *Brugere – Picoux J. (ed.) Pathologie du lapin de compagnie et des rongeurs domestiques* 2°ed *E.N.V. Alfort Paris*, 157-166; 1989.

36) MUREAU (1988) cit. da Renault L., 1989.

37) OLNEY J.T. (1928) cit. da Grilli G. *et al*, 1996.

38) PACHECO, SEGOVIA (1999) cit. da Rosell J.M., 2000.

39) PAPPARELLA V., CRINGOLI G., MENNA L.F. L'allevamento del coniglio nel Mezzogiorno d'Italia: diffusione e pericolosità delle Salmonellosi. *Riv. Coniglicoltura*, XXIII (2), 52-54; 1986.

40) PATTON N.M. Important factor affecting doe losses. *Proc. 4° World Rabbit Congress*, 1996, 83-88; 1992.

41) RENAULT L. Les maladies de l'appareil reproducteur chez le lapin. *Brugere – Picoux J, (*ed.) in *Pathologie du lapin de compagnie et des rongeurs domestique.s E.N.V. Alfort, Paris*, 125-138; 1989.

42) ROBERTS S.J. (1986) cit. da Rosell J.M., 2000.

43) ROSELL PUJOL J.M. Enfermedades del conejo. *Enfermedades- tomo II, Ediciones Mundi- Prensa*, Madrid, Espana; 2000.

44) SACO M., BADIOLA J.I., ROSELL J.M. (1997) cit. da Rosell J.M., 2000.

45) SCUOTA S., CENCI T., CASTELLINI C., LATTAIOLI P., TITOLI F., VITELLI B., MOSCATI L. Ricerca del virus della Mixomatosi nel liquido seminale di conigli riproduttori infettati sperimentalmente: implicazioni nella pratica dell'inseminazione artificiale. *Atti S.I.S.Vet., Riccione*, 1169-1173; 1993.

46) TRAUB E. (1943) cit. da Civera T. *et al*, 1987.

47) VETÉSI F., KEMENES F. (1967) cit. da Civera T. *et al*, 1987.

48) WEISBROTH S.H., FLATT R., KRAUS A.L. (1974) cit. Da Civera T. *et al*, 1987.

49) ZANON F., SILIOTTO R., FACCHIN E. Salmonella typhimurium infection in a commercial rabbitry. *Proc. 6th World Rabbit Congress, Toulouse*, 1996, vol.3, 131-133. 1996.

PROBLEMATICHE LEGATE AL DEFICIT ENERGETICO NELLE CONIGLIE

GEROLAMO XICCATO

Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Padova

I ritmi intensivi di riproduzione utilizzati nell'allevamento commerciale comportano l'ampia sovrapposizione della lattazione e della gravidanza nella coniglia. I fabbisogni energetici di lattazione e contemporanea gravidanza sono molto elevati e non possono essere soddisfatti con la sola ingestione alimentare, comportando di conseguenza l'utilizzazione delle riserve corporee e la presenza, alla fine della lattazione, di un bilancio energetico corporeo negativo (XICCATO, 1996).

Il bilancio corporeo è dato dalla differenza tra l'energia assunta con l'alimento e l'energia spesa per i processi digestivi, di mantenimento e di produzione. Animali in buona condizione ingeriscono generalmente una quantità di alimento sufficiente a soddisfare i propri fabbisogni energetici. Nel coniglio, la regolazione dell'appetito è controllata prevalentemente da meccanismi chemiostatici (glicemia), grazie ai quali la quantità totale di energia ingerita giornalmente tende ad essere costante e proporzionale al peso vivo metabolico ($PV^{0.75}$).

Nei conigli in accrescimento, il consumo volontario di energia digeribile (ED) è circa 900-1000 kJ/d/kg $PV^{0.75}$. La regolazione chemiostatica si manifesta solo a concentrazioni della dieta superiori a 9-9,5 MJ/kg (LEBAS, 1989), mentre nel caso di diete poco energetiche tende a prevalere un controllo dell'appetito basato su fattori fisici, ossia l'ingombro dell'alimento nel tubo digerente.

Nelle coniglie fattrici, l'ingestione volontaria di energia alimentare è stimolata dagli elevati fabbisogni di lattazione e gravidanza ed è pertanto superiore rispetto ai conigli in accrescimento, variando durante il periodo di lattazione da 1100 a 1300 kJ DE/d/kg $PV^{0.75}$, con valori crescenti dalle primipare alle pluripare (PARIGI BINI e coll., 1992; XICCATO e coll., 1995). La soglia di concentrazione energetica per l'instaurarsi del controllo chemiostatico è superiore nelle femmine allattanti (10,5-11 MJ/kg), per cui aumentando la concentrazione di ED da 10 a 11 MJ/kg, l'ingestione giornaliera di ED tende ad aumentare (MAERTENS E DE GROOTE, 1988; CASTELLINI E BATTAGLINI, 1991). Nelle coniglie fattrici, inoltre, la soglia di regolazione energetica dipende dalla fonte energetica della dieta e tende ad essere superiore nelle diete grassate (meno ingombranti) rispetto a quelle ricche di amido (XICCATO e coll., 1995; FORTUN-LAMOTHE, 1997).

In ogni caso, l'ingestione volontaria sembra essere più variabile nelle coniglie fattrici che nei conigli in accrescimento e legata allo stato fisiologico, all'età e all'ordine di parto. Durante la prima gravidanza, si osserva un consumo alimentare moderato (180-200 g/d), seguito da una forte riduzione in prossimità del primo parto. Successivamente, i consumi aumentano rapidamente con l'avvio della lattazione fino raggiungere i livelli massimi verso i 15-20 giorni di lattazione (300-400 g/d). Con lo svezzamento, il fabbisogno energetico di lattazione cessa e il consumo diminuisce rapidamente durante il periodo di asciutta, anche se non raggiunge mai livelli basali. Durante la seconda e le successive lattazioni, il consumo alimentare segue lo stesso andamento della prima lattazione, mantenendosi però su valori medi superiori e crescenti fino alla 4-5ª lattazione, dopodiché il consumo tende a stabilizzarsi.

Gli studi sul deficit energetico hanno riguardato prevalentemente le coniglie primipare che sono ancora in fase di accrescimento e presentano una capacità di ingestione inferiore rispetto alle pluripare. L'output energetico di lattazione è particolarmente elevato rispetto ad altre specie, a causa dell'elevata produzione di latte (200-350 g/d) e dell'elevata concentra-

zione di sostanza secca (30-35%), proteina (10-15%) e grasso (12-15%) nel latte, con un valore energetico quasi 3 volte superiore rispetto al latte vaccino (PARIGI BINI e coll., 1992; PASCUAL e coll., 1999).

Durante la prima lattazione, il corpo della coniglia è quindi sottoposto ad un'intensa riduzione delle riserve energetiche a causa della mobilizzazione dei tessuti adiposi, mentre le riserve proteiche non vengono modificate (PARIGI BINI E XICCATO, 1998). Diversamente da altre specie, le perdite energetiche rimangono costanti durante tutta la lattazione (PARIGI BINI e coll., 1990) e non si osserva un recupero durante la fase finale, a causa dell'elevata produzione di latte anche dopo 20-25 giorni.

La capacità d'ingestione aumenta in media del 10-20% tra la prima e la seconda lattazione, del 7-10% tra la seconda e la terza lattazione e del 3-7% tra la terza e la quarta lattazione, per poi stabilizzarsi (CASTELLINI E BATTAGLINI, 1991; PARIGI BINI e coll., 1989; BATTAGLINI E GRANDI, 1991). Tuttavia, poiché all'aumentare dell'ordine di parto aumenta anche la produzione di latte, a dispetto di quanto comunemente ritenuto, la perdita di energia da un parto al successivo, pur riducendosi, non si annulla completamente e anche le coniglie al quarto parto possono trovarsi con un bilancio energetico negativo rispetto al parto precedente (PARTRIDGE e coll., 1986; PASCUAL e coll., 2000; XICCATO e coll., 2001) (Figura 1).

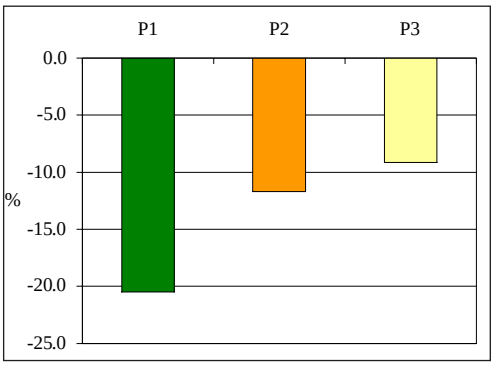


Figura 1. Bilancio energetico in coniglie durante il primo (P1), secondo (P2) e terzo (P3) interparto (Xiccato e coll., 2001).

Il deficit nutrizionale di lattazione può determinare una diminuzione dell'efficienza riproduttiva (VIUDES-DE-CASTRO e coll., 1991; FORTUN E LEBAS, 1994; FORTUN-LAMOTHE E BOLET, 1995). In pratica, non rimanendo gravida la coniglia si sottrae al ciclo continuo lattazione-gravidanza-parto ed entra in una fase di asciutta sufficientemente lunga per un adeguato recupero delle condizioni corporee.

La riduzione del deficit energetico e il recupero delle condizioni corporee sono perseguibili anche aumentando l'input giornaliero di energia, ossia stimolando la capacità di ingestione alimentare. La selezione e i programmi di incrocio nelle linee ibride commerciali utilizzate sono stati fino a questo momento finalizzati alla massimizzazione delle prestazioni riproduttive (numero di coniglietti nati e svezzati, produzione di latte), senza curarsi di aumentare adeguatamente la capacità di ingestione volontaria per mantenere in equilibrio il bilancio corporeo della femmina (DE ROCHAMBEAU, 1990; MAERTENS, 1992; XICCATO, 1996). Gli studi finalizzati alla riduzione del deficit energetico nelle coniglie nel corso della loro prima gravidanza e lattazione sono stati dapprima orientati a stimolare l'ingestione di energia, sfruttando l'imperfetta regolazione chemiostatica dell'appetito nelle coniglie fattrici. Come sopra descritto, in questi animali, ad un aumento del contenuto di energia della dieta, non corrisponde una proporzionale riduzione dell'ingestione di alimen-

to, per cui l'ingestione totale di energia tende ad aumentare (XICCATO e coll., 1995; PASCUAL e coll., 1999).

In un nostro studio (XICCATO e coll., 1995), l'aumento della concentrazione energetica della dieta ottenuto mediante un maggior contenuto di amido (dieta A) o di grasso (dieta G), pur determinando un aumento dell'ingestione di ED, ha comportato anche un aumento della produzione di latte. Pertanto, il bilancio energetico è rimasto negativo indipendentemente dalla dieta, con perdite del 13-15% del contenuto energetico iniziale nel caso delle coniglie solo allattanti e di ben 22-27% nel caso delle coniglie contemporaneamente gravide ed allattanti (Figura 2).

Considerato che neppure altri studi (FORTUN-LAMOTHE, 1997; PASCUAL e coll.,

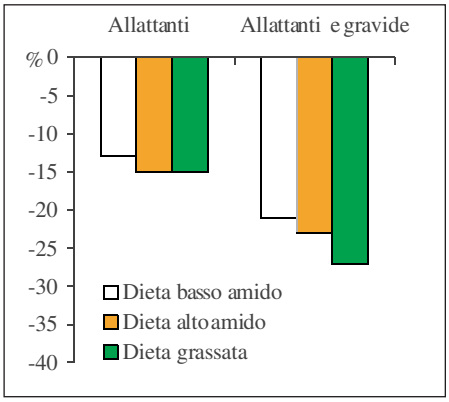


Figura 2.Bilancio dell'energia in coniglie allattanti e in coniglie contemporaneamente gravide e allattanti (Xiccato e coll., 1995).

2000) sono riusciti a ridurre il deficit corporeo attraverso l'aumento del contenuto energetico della dieta, la ricerca si è orientata a migliorare l'alimentazione della giovane fattrice, prevedendo la somministrazione di diete con un elevato contenuto di fibra durante l'accrescimento e fino all'inseminazione. Questi piani alimentari sono in grado di aumentare la capacità di ingestione nelle successive fasi di lattazione, con un effetto positivo sul bilancio energetico corporeo alla fine della prima lattazione (XICCATO e coll., 1999).

Nel complesso, le strategie alimentari non sono risultate in grado da sole di ovviare al problema del deficit energetico nelle coniglie. Un intervento di tipo gestionale sembra essere necessario e una riduzione dello sfruttamento della riproduttrice appare inevitabile, anche con l'adozione di ritmi riproduttivi alternativi rispetto a quelli attuali (CASTELLINI E BATTAGLINI, 1991; CASTELLINI e coll., 2003).

Il ritmo riproduttivo intensivo con accoppiamento *post-partum* (*pp*) è quello che determina la totale sovrapposizione della lattazione e della gravidanza, inducendo così un aggravamento del bilancio energetico della fattrice. In questa situazione, oltre alle forti perdite di lipidi corporei, si osservano anche perdite proteiche a causa dell'elevato fabbisogno per lo sviluppo fetale. Inoltre le lattazioni si susseguono tanto ravvicinate da provocare un impoverimento sempre più accentuato delle riserve corporee, con riflessi negativi sulla fertilità e sulla carriera riproduttiva.

Confrontando coniglie solo gravide con coniglie contemporaneamente gravide e allattanti, è stato rilevato un bilancio energetico nettamente positivo nelle prime (+12.5 MJ a 28 giorni di gravidanza) e un bilancio nettamente negativo (-11.8 MJ) nelle seconde (FORTUN, 1994) (Tabella 1).

		Solo gravide	Gravide e allattanti
Ingestione di ED	MJ	54,72	87,35
Fabbisogni di ED:			
• Mantenimento	MJ	33,21	35,51
• Lattazione	MJ		57,11
• Gravidanza	MJ	9,00	6,51
• Bilancio totale	MJ	+12,51	-11,78

Tabella 1. Bilancio energetico in coniglie solo gravide ed in coniglie contemporaneamente gravide e allattanti al 28° giorno della seconda gravidanza (Fortun, 1994).

In pratica, gli allevatori hanno abbandonato il ritmo riproduttivo *post-partum*, proprio per la scarsa fertilità, la ridotta numerosità delle nidiate e l'elevato tasso di rinnovo delle fattrici. Più frequente è l'impiego di un ritmo semi-intensivo, con accoppiamento a 10-12 giorni *pp*, corrispondente ad un interparto teorico di 42 giorni (6 settimane), ottimo compromesso tra l'economia dell'impresa e le esigenze metaboliche della coniglia (Figura 3). Questo ritmo consente la ciclizzazione delle operazioni di allevamento, favorisce il mantenimento di buone condizioni corporee materne, ottimizza i risultati di fertilità e produttività numerica e, infine, rende possibile uno svezzamento più tardivo (32-35 giorni) con nidiate più pesanti e resistenti.

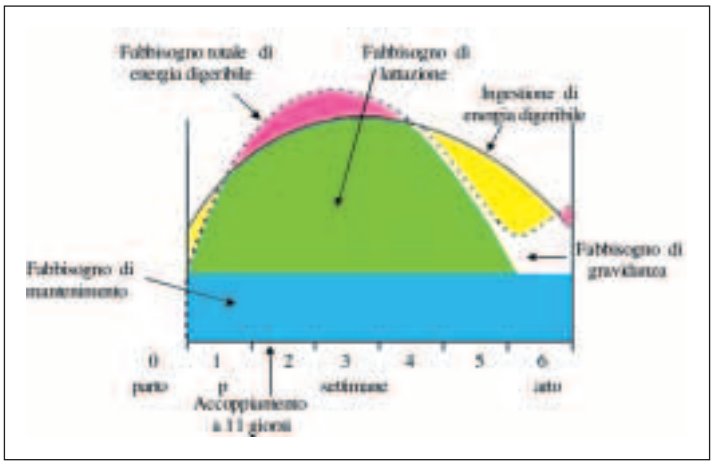


Figura 3. Evoluzione del fabbisogno (curva tratteggiata) e ingestione energetica (curva continua) in un interparto di 6 settimane. Le aree in rosso indicano periodi in cui la coniglia è in bilancio energetico negativo e utilizza le riserve corporee; le aree in giallo rappresentano le fasi di bilancio positivo con recupero dell'energia corporea (Xiccato, 1993)

Un ritmo riproduttivo più estensivo, con un interparto di 7-8 settimane, richiede un controllo dell'ingestione, per evitare un eccessivo ingrassamento delle fattrici e riflessi negativi sulla fertilità e sulla prolificità (VIUDES-CASTRO e coll., 1991). Anche se ritmi semi-intensivi ed estensivi consentono in teoria il mantenimento dell'equilibrio energetico, PARIGI BINI e coll. (1996) hanno dimostrato che coniglie primipare riaccoppiate 12 d *pp* non evitano il deficit energetico che rimane pari a circa -26% del contenuto iniziale e che nemmeno un riaccoppiamento più tardivo (28 d *pp*) permette il recupero del deficit di lattazione,

che rimane a -16% (Figura 4). Questi risultati sono stati confermati anche in uno studio più recente (XICCATO, 2003, dati non pubblicati) e possono essere spiegati con il fatto che, entro pochi giorni dall'entrata in asciutta, l'ingestione alimentare si riduce drasticamente, rallentando così il processo di recupero delle condizioni corporee.

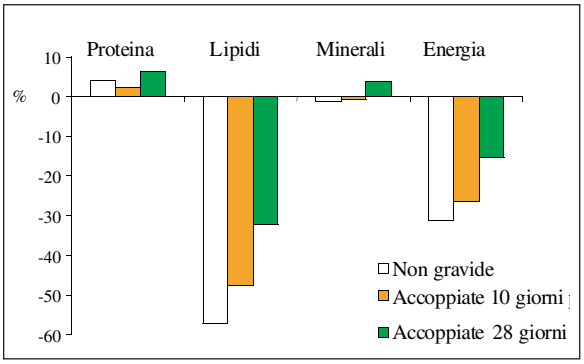


Figura 4. Effetto del ritmo riproduttivo sul bilancio corporeo di coniglie fattrici (Parigi Bini e coll., 1996)

Dal punto di vista gestionale, si può anche puntare a ridurre l'output di energia mediante la riduzione della durata della lattazione. Proprio su questa base, sono stati recentemente svolti una serie di studi sugli effetti dello svezzamento precoce sulle prestazioni riproduttive e sul bilancio energetico delle coniglie fattrici, ma anche sulla condizione dei coniglietti svezzati precocemente (XICCATO e coll., 2000; 2001; GUTIÉRREZ e coll., 2002). Lo svezzamento precoce, ossia anticipato rispetto ai tradizionali 32-35 giorni, permetterebbe di ridurre i contatti fra nidiate e fattrici, diminuendo la possibilità di trasmissione di patogeni, e di utilizzare alimenti specifici per i conigli svezzati precocemente, coprendo adeguatamente le esigenze nutrizionali e fisiologiche dei coniglietti, oltre che ridurre la durata della lattazione.

Dal punto di vista della fattrice, esistono pochi riscontri sperimentali sull'effetto dell'età di svezzamento su prestazioni riproduttive e bilancio energetico. In un recente studio (XIC-

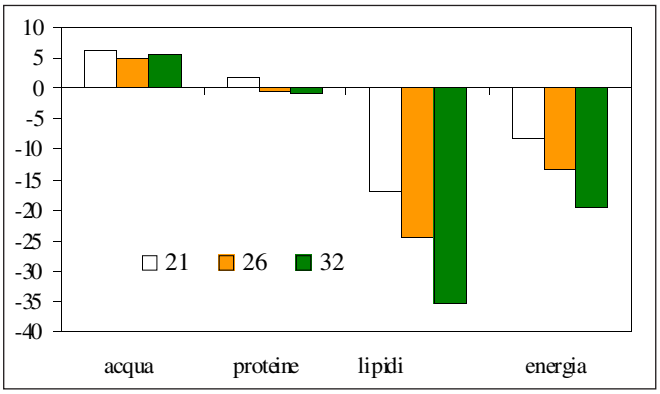


Figura 5. Bilancio corporeo (%) di coniglie le cui nidiate sono state svezzate all'età di 21, 26 e 32 d (Xiccato e coll., 2001)

CATO e coll., 2001), l'adozione di uno svezzamento molto precoce delle nidiate (21 giorni di età) ha consentito di diminuire il periodo di utilizzazione delle riserve corporee per la sintesi del latte e di aumentare il periodo di asciutta. Tuttavia, nei giorni immediatamente successivi allo svezzamento, le coniglie hanno manifestato una rapida riduzione dell'ingestione di alimento (da 350 g/d a 180-200 g/d), verosimilmente accentuata dallo stress fisiologico e metabolico dovuto all'improvvisa interruzione della lattazione nel momento di massima produzione, particolarmente forte nel caso di coniglie pluripare. La riduzione dell'età di svezzamento, da 32 a 21 giorni di età, ha determinato una riduzione del deficit corporeo, che tuttavia non è scomparso completamente (Figura 5).

In conclusione, la comparsa del deficit energetico nella coniglia fattrice deve essere considerata fisiologica e praticamente inevitabile, almeno negli ibridi altamente produttivi utilizzati negli allevamenti commerciali. Nel caso di ritmi riproduttivi intensivi con riaccoppiamento *post-partum*, il deficit proteico può sommarsi a quello energetico. Nei cicli riproduttivi successivi al primo, il deficit energetico tende a ridursi, ma non a scomparire del tutto e solo la mancata gravidanza può consentire il completo recupero delle riserve corporee. La stimolazione dell'appetito mediante l'impiego di diete ricche di amido o di grasso non rappresenta una soluzione al problema in quanto determina un contemporaneo aumento della produzione di latte. Le sole strategie in grado di ridurre, se non di evitare, il deficit energetico di lattazione e gravidanza sono l'adozione di ritmi riproduttivi estensivi, ossia l'aumento dell'intervallo parto-accoppiamento, e l'applicazione dello svezzamento precoce, in grado di ridurre la produzione totale di latte e, contemporaneamente, di allungare il periodo di asciutta.

BIBLIOGRAFIA

1) BATTAGLINI M., GRANDI A. Effetto della fase fisiologica, della stagione e dell'ordine di parto sul comportamento alimentare della coniglia fattrice. *Proceedings IX Congresso Nazionale A.S.P.A.*, Roma, Vol. I, 465-475. 1991.

2) CASTELLINI C., BATTAGLINI, M. Influenza della concentrazione energetica della razione e del ritmo riproduttivo sulle performance delle coniglie. *Proc. IX Congresso Nazionale A.S.P.A., Roma*, Vol. I, 477-488. 1991.

3) CASTELLINI C., DAL BOSCO A., LATTAIOLI P. Comparison of different reproductive protocols for rabbit doe: effect of litter size and mating interval. *Livest. Prod. Sci*. (in corso di stampa). 2003.

4) DE ROCHAMBEAU H. Genetique du lapin domestique pour la production de poil et la production de viande: revue bibliographique 1984-1987. *Cuni-Science* 6(2) 17-48. 1990.

5) FORTUN, L. Effets de la lactation sur la mortalité et la croissance foetale chez la lapine primipare. *PhD thesis. Université de Rennes (France).* 1994.

6) FORTUN L., LEBAS F. Effets de l'origine et de la teneur en énergie de l'aliment sur les performances de reproduction de lapines primipares saillies post-partum. Premiers résultats *Proceedings 6èmes Journées de la Recherche Cunicole*, La Rochelle (France), Vol. II, 285-292. 1994.

7) FORTUN-LAMOTHE L. Effects of dietary fat on reproductive performance of rabbit does. A review. *World Rabbit Sci.* 5, 33-38. 1997.

8) FORTUN-LAMOTHE L., Bolet G. Les effets de la lactation sur les performances de reproduction chez la lapine. *INRA Production Animale* 8, 49-56. 1995.

9) GUTIÉRREZ I., ESPINOSA A., GARCÍA J., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early weaned rabbits. J. Anim. Sci. 80, 1029-1037. 2002.

10) LEBAS F. Besoins nutritionnels des lapins. Revue bibliographique et perspectives. *Cuni-Sciences* 5(2), 1-28. 1989.

11) MAERTENS L. Rabbit nutrition and feeding: a review of some recent developments. *Proceedings 5th World Rabbit Congress* (Corvallis, Oregon)*, Journal Applied Rabbit Research* 15, 889-913. 1992.

12) MAERTENS L., DE GROOTE G. The influence of the dietary energy content on the performances of post-partum breeding does. *Proceedings 4th World Rabbit Congress*, Budapest, Vol. 3, 42-52. 1988.

13) PARIGI BINI R, XICCATO G. Energy metabolism and requirements. In: De Blas C., Wiseman J. (Eds.) *The Nutrition of the Rabbit.* CABI Publishing. CAB International, Wallingford Oxon, UK, pp. 103-131. 1998.

14) PARIGI BINI R., XICCATO G., CINETTO M. Influenza dell'intervallo parto-accoppiamento sulle prestazioni riproduttive delle coniglie fattrici. *Coniglicoltura* 26(7), 51-57. 1989.

15) PARIGI BINI R., XICCATO G., CINETTO M. Repartition de l'énergie alimentaire chez la lapine non gestante pendant la première lactation. *Proceedings 5èmes Journées de la Recherche Cunicole,* Paris, Vol. II, Communication 47, 1-8. 1990.

16) PARIGI BINI R., XICCATO G., CINETTO M., DALLE ZOTTE A. Energy and protein utilization and partition in rabbit does concurrently pregnant and lactating. *Animal Production* 55, 153-162. 1992.

17) PARIGI BINI, R., XICCATO, G., CINETTO, M., DALLE ZOTTE, A., CARAZZOLO, A., CASTELLINI, C. AND STRADAIOLI, G. Effect of remating interval and diet on the performance and energy balance of rabbit does. *Proceedings 6th World Rabbit Congress*, Toulouse (France), Vol. 1, 253-258. 1996.

18) PARTRIDGE G.G., LOBLEY G.E., FORDYCE R.A. Energy and nitrogen metabolism of rabbits during pregnancy, lactation, and cuncurrent pregnancy and lactation. *British Journal of Nutrition* 56, 199-207. 1986.

19) PASCUAL J.J., CERVERA C., BLAS E., FERNÁNDEZ-CARMONA J. Effect of high fat diets on the performance, milk yield and milk composition of multiparous rabbit does. *Anim. Sci.* 68, 151-162. 1999.

20) PASCUAL J.J., CERVERA C., FERNÁNDEZ-CARMONA J. The effect of dietary fat on the performance and body composition of rabbit in their second lactation. *Anim. Feed Sci. Tecnol.* 86, 191-203. 2000.

21) VIUDES-DE-CASTRO P., SANTACREU M.A., VICENTE J.S. Effet de la concentration énergétique de l'alimentation sur les pertes embryonnaires et foetales chez la lapine. *Reproduction Nutrition Development* 31, 529-534. 1991.

22) XICCATO G. Come alimentare il coniglio. *Professione Allevatore* 18(1), 27-40. 1993.

23) XICCATO G. Nutrition of lactating does. *Proceedings 6th World Rabbit Congress,* Toulouse (France), Vol. 1, 29-50. 1996.

24) XICCATO G., BERNARDINI M., CASTELLINI C., DALLE ZOTTE A., QUEAQUE P.I., TROCINO A., Effect of post-weaning feeding on the performance and energy balance of female rabbits at different physiological states. *J. Anim. Sci*. 77, 426-416. 1999.

25) XICCATO G., PARIGI BINI R., DALLE ZOTTE A., CARAZZOLO A., COSSU M.E., 1995. Effect of dietary energy level, addition of fat and physiological state on performance and energy balance of lactating and pregnant rabbit does. *Animal Science* 61, 387-398.

26) XICCATO G., TROCINO A., SARTORI A., QUEAQUE P.J. Early weaning of rabbits: effect of age and diet on weaning and post-weaning performance. *Proc. 7th World Rabbit Congress,* 4-7 July 2000 Valencia, Spain, Vol. C, 483-490. 2000

27) XICCATO G., TROCINO A., SARTORI A., QUEAQUE P.I. Effect of weaning age and parity order on reproductive performance and body balance of rabbit does. *Proc. 2nd Meeting COST Action 848*, 20-30 June 2001, Godollo, Hungary, 54-55. 2001.

RITMI RIPRODUTTIVI E BENESSERE DELLA FATTRICE

CESARE CASTELLINI

Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Perugia

La redditività di un allevamento cunicolo dipende dal numero e dal peso dei conigli venduti all'anno che può essere riferito alla gabbia madre o alla fattrice. Il primo riferimento è quello più comunemente adottato, sia perché il costo della gabbia è di gran lunga superiore a quello della coniglia fattrice, sia perché quest'ultima non ha le capacità fisiologiche per produrre il numero annuale di conigli ritenuto ottimale (50-52) nella nostra realtà operativa.

D'altra parte è opportuno che la produttività della fattrice non si discosti molto da quella della gabbia-madre onde evitare di mantenere un numero troppo elevato di femmine in attesa. Nel contempo è sconsigliabile "forzare" troppo la coniglia perché la quota di rimonta supererebbe il limite economico accettabile. E' quindi di primaria importanza individuare una strategia gestionale che rappresenti un giusto compromesso.

Come è noto la produttività per fattrice può essere incrementata sia aumentando il numero di svezzati per nidiata, sia riducendo l'interparto.

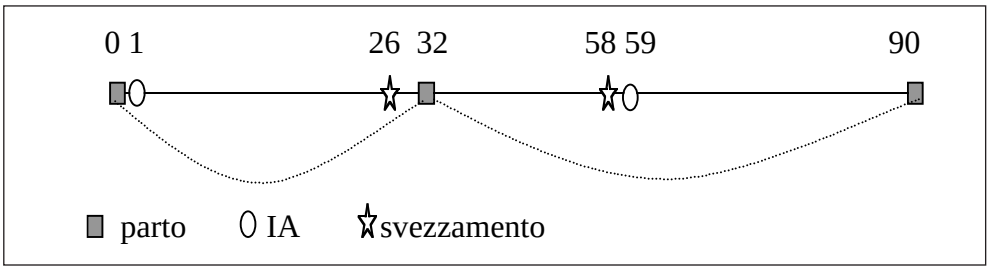
In entrambi i casi, il ruolo della lattazione è determinante perché peso e sopravvivenza dei conigli dipendono dalla quantità di latte ingerita, mentre alti livelli di prolattina possono pregiudicare le funzioni riproduttive.

La diffusione della produzione ciclizzata e dell'inseminazione artificiale ha migliorato la gestione dell'allevamento ma ha al contempo incrementato la mortalità dei coniglietti e la quota di riforma delle fattrici.

Il protocollo attualmente più applicato è quello basato sulla inseminazione delle coniglie 11 giorni dopo il parto e sullo svezzamento delle nidiate a 28-30 giorni di età. Le femmine infeconde seguono lo stesso schema di inseminazione di quelle gravide rientrando nel successivo ciclo. Nei periodi di bassa fertilità questo protocollo può quindi prolungare troppo l'interparto. Inoltre al momento della IA la recettività sessuale è piuttosto bassa, tanto da richiedere spesso l'uso di ormoni per raggiungere livelli soddisfacenti di fertilità. La recettività della coniglia è infatti afasica e mostra un trend del tutto peculiare: è molto alta subito dopo il parto, successivamente decresce seguendo un andamento alquanto irregolare, presenta poi un altro picco dopo lo svezzamento.

In sintonia con questa situazione la coniglia, in condizioni naturali e durante la stagione riproduttiva, si accoppia subito dopo il parto ed allatta la nidiata per circa 25 giorni. Tenendo conto che il coniglio domestico manifesta ancora molti atti comportamentali tipici del suo repertorio naturale, è lecito presumere che rispettando tale comportamento si migliorino le condizioni di benessere della coniglia fattrice.

Ricerche condotte in tal senso hanno evidenziato che il ritmo *post-partum* consente di



ottenere un maggior numero di parti/anno/fattrice, ma riduce la fertilità e la consistenza numerica della nidiata ed aumenta la quota di riforma, ad indicare che molte coniglie non riescono a sostenere questo ritmo. Se ne è dedotto che il ritmo *post-partum* applicato con continuità, è poco rispettoso delle condizioni di benessere della coniglia. Questa constatazione ha stimolato ulteriori sperimentazioni basate sull'alternanza di due ritmi: *post-partum* (**pp**) e post-svezzamento (**pw**). L'allattamento è stato interrotto a 26 giorni e le nidiate sono state pareggiate a 6 o a 8 coniglietti.

Il ritmo alternato, rispetto a quello fisso classico con IA 11 giorni dopo il parto, ha consentito di ottenere migliori livelli di recettività e fertilità tanto da non modificare la durata dell'interparto anche se l'intervallo tra inseminazioni era più lungo di 3 giorni.

		Fisso		**Alternato**	
		L6	**L8**	**L6**	**L8**
Recettività	%	67,9b	61,8a	78,7d	73,9cd
Fertilità	%	73,6b	63,4a	78,6b	72,3b
Interparto	d	53,1A	57,4B	55,2A	58,1B
Nati vivi	n	8,5	8,2	8,4	8,5
Conigli svezzati	n	5,6A	6,8B	5,7A	7,0B
Mortalità pre-svezzamento	%	6,7A	15,0B	5,0 A	12,5B

La fattrice ha inoltre subito un deficit inferiore ed ha quindi mantenuto pesi corporei superiori tanto da condurre ad un più basso tasso di riforma. Anche le prestazioni dei coniglietti sono migliorate in termini di peso corporeo a 70 giorni e di mortalità totale. La miglior produttività globale (numero e peso di conigli/anno/fattrice) è stata ottenuta applicando il ritmo alternato con 8 coniglietti per nidiata.

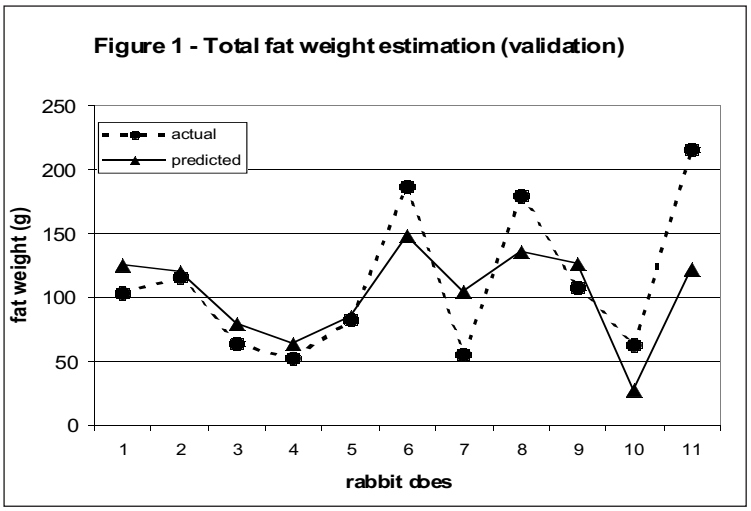
		Fisso		**Alternato**	
		L6	**L8**	**L6**	**L8**
Conigli venduti/anno/fattrice	n	35.7	35.6	33.8	37.7
Peso vivo venduto/anno/fattrice	kg	83.5	81.9	79.8	86.7
Produzione reale/teorica	%	67.9	49.9	70.0	57.2
Mortalità totale (con. allattatati-venduti)	%	13.3	30.0	15.0	25.0
Riforma fattrici	%	60	90	60	80
Fattrici con 3 consecutive IA negative	%	30	50	30	50

Analizzando più in dettaglio e separatamente i due ritmi (**pp** e **pw**) non sono state riscontrate modifiche nella frequenza nel tasso di ovulazione rispetto a quanto ottenuto in coniglie inseminate in continuità 11 giorni dopo il parto.

La recettività è stata peraltro superiore in entrambe i gruppi sperimentali grazie all'inversione del rapporto progesterone/estrogeni (**pp**) o alla più ridotta interferenza della prolattina a livello endocrino (**pw**). La fertilità ha invece raggiunto la punta massima nelle fattrici con ritmo pw perché nel pp la contemporaneità lattazione-gestazione ha aumentato il deficit energetico e le peggiori condizioni della coniglia hanno amplificato l'antagonismo prolattina-gonadotropine. Anche la mortalità embrionale è stata superiore, compensata però da una minore mortalità fetale. In definitiva quindi il numero di coniglietti nati dalle fattrici con ritmo *post-partum* non è stato significativamente diverso rispetto al controllo.

		Fisso	Alternato	
		controllo	pp	pw
Recettività	%	60,1a	83,7b	75,1b
Ovulazione	“	100	100	100
Fertilità	“	66,7a	60,0a	93,3b
Corpi lutei	n.	10,5	11,2	10,7
Embrioni	n/fattrice fertile	9,0b	8,0a	9,0b
Nati vivi	“	8,2a	7,9a	9,0b
Mortalità embrionale	%	14,3a	28,5b	15,8a
Mortalità fetale	“	8,9b	1,2a	0a
Mortalità totale	“	21,9b	29,8b	15,8a

Analizzando poi le condizioni corporee delle fattrici, che sono state misurate in vivo mediante ecografia, è stato visto che il ritmo alternato, rispetto a quello fisso, mantiene più elevata l’adiposità perirenale e retroscapolare, in termini sia di spessore (stimato) che di peso del grasso (macellazione comparativa).



In conclusione si può affermare che il ritmo alternato, con 8 coniglietti è più rispettoso delle esigenze fisiologiche della coniglia (recettività, fabbisogni energetici, durata della carriera riproduttiva), rispetto a quello fisso con AI 11 giorni dopo il parto e consente di ottenere una migliore produttività globale.

TECNICHE DI SVEZZAMENTO PRECOCE E BENESSERE DEI CONIGLIETTI

Alessandro Dal Bosco[1], Angela Trocino[2]

[1] Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Perugia
[2] Dipartimento di Scienze Zootecniche, Università degli Studi di Padova

Negli allevamenti cunicoli italiani, la separazione dei coniglietti dalle madri viene effettuata generalmente intorno al 32-35° giorno di età, quando il consumo di latte è ormai irrilevante rispetto all'assunzione di alimento solido. Uno svezzamento tardivo verso i 35 giorni e a pesi piuttosto elevati è di solito raccomandato per ridurre la mortalità post-svezzamento (LEBAS, 1993; REMOIS e coll., 1996). Tuttavia, la correlazione fra età e peso allo svezzamento e mortalità nelle fasi successive non è chiaramente dimostrata (PEREZ e coll., 1996). Secondo alcuni autori, il peso allo svezzamento è correlato solo con il peso finale degli animali, indipendentemente dall'età di svezzamento (DE BLAS e coll., 1981). Secondo altri autori, sono il peso alla nascita e l'ingestione di latte i fattori che possono giocare un ruolo chiave su mortalità e prestazioni successive (MORISSE, 1987; SZENDRO, 2000).

Dal punto di vista gestionale, uno svezzamento precoce permette un'alimentazione separata della fattrice e della nidiata e, quindi, una migliore copertura delle diverse esigenze nutrizionali delle due categorie di animali. Inoltre, uno svezzamento anticipato potrebbe diminuire la trasmissione di malattie fra fattrice e nidiata e migliorare la condizione corporea delle coniglie, per la minore durata della lattazione (DE BLAS e coll., 1999; XICCATO e coll., 2003a).

Nel periodo peri-svezzamento, una delle maggiori cause di mortalità e, quindi, di perdita economica dell'allevamento è rappresentata dalle enteropatie non specifiche. I coniglietti sono molto sensibili a disturbi digestivi nel momento del passaggio dall'alimentazione lattea all'alimentazione solida, essendo le fermentazioni ciecali in una fase di rapido sviluppo e il corredo enzimatico intestinale non ancora completo (MAERTENS, 1992; GIDENNE e FORTUN-LAMOTHE, 2002). I coniglietti iniziano a ingerire l'alimento solido a partire dai 16-18 giorni di vita, con sensibili variazioni in funzione del numero di animali per nidiata e della disponibilità di latte (SZENDRO, 2000). A 21 giorni, l'ingestione di latte è ancora predominante, la produzione di acidi grassi volatili nel cieco limitata e il rapporto propionato/butirrato più alto di quello che si riscontra nei conigli svezzati (PADHILA e coll., 1995; PIATTONI e coll., 1995). Attorno ai 25 giorni, il consumo individuale di alimento raggiunge i 25-30 g/d; successivamente, la quantità ingerita aumenta di circa 5 g/d. Il coniglietto passa da una sola poppata a numerosi pasti solidi (25-30) e liquidi alternati e irregolarmente ripartiti nel corso delle 24 ore. Durante la quarta settimana di età, il consumo di alimento solido diventa predominante rispetto all'ingestione di latte e l'attività fermentativa ciecale si sviluppa rapidamente.

In questa fase, i problemi digestivi che si osservano nei coniglietti sono solitamente associati alla composizione della dieta ed in particolare all'elevata concentrazione di amido (CHEEKE, 1987; LEBAS e coll., 1998). I conigli ancora allattanti sono infatti in grado di digerire molto efficientemente il grasso del latte materno grazie all'elevata attività lipasica intestinale, mentre evidenziano una digestione incompleta dell'amido a causa dell'attività amilasica ancora inadeguata (GIDENNE, 1996; DOJANA e coll., 1998). Pertanto, si raccomanda la somministrazione di diete specifiche da svezzamento, ricche di fibra e povere di amido, anche se queste non rispondono adeguatamente ai fabbisogni delle coniglie fattrici (LEBAS e MAITRE, 1989; Xiccato, 1996; GIDENNE e FORTUN-LAMOTHE, 2002). Anche l'utilizzo di un'alimentazione verde con foraggi freschi è al momento motivo di inte-

resse per alcuni ricercatori, che stanno studiando la possibilità di migliorare le condizioni dei coniglietti a livello ciecale.

Al momento dello svezzamento, l'allevatore può trovarsi di fronte a diverse opzioni (GIDENNE e FORTUN-LAMOTHE, 2002). Volendo operare uno svezzamento convenzionale (28-35 giorni), per superare alcuni dei problemi sopra citati, si potrebbe pensare ad un'alimentazione separata madre/nidiata (FORTUN-LAMOTHE e coll., 2000). Per la realizzazione di questa, sono state avanzate varie proposte di tipo strutturale, basate sull'uso di griglie selettive davanti alla mangiatoia o di dispositivi regolati dal peso, che permettono l'uso di due mangiatoie all'interno della stessa gabbia e, quindi, un'alimentazione differenziata dei coniglietti e della madre. Tali soluzioni, per il momento solo sperimentali, sembrano avere buone possibilità di impiego negli allevamenti commerciali, previa attuazione di qualche modifica. Tuttavia, alcuni autori hanno manifestato qualche perplessità sull'impiego di un'alimentazione separata fattrice-nidiata, evidenziando il ruolo fondamentale della madre nei meccanismi di imprinting trasmessi alla nidiata e di stimolo al consumo di mangime.

Nel caso di uno svezzamento ad età inferiore ai 26 giorni, si avrebbe la possibilità di usufruire di tutti i vantaggi di uno svezzamento precoce precedentemente citati. Tuttavia, molta attenzione dovrebbe essere posta alla disponibilità di acqua e mangime. È stato osservato che solo 24-36 ore dopo l'ultimo allattamento, i conigli svezzati molto precocemente (<23 giorni) cominciano prima a bere e successivamente a mangiare (PIATTONI e MAERTENS, 1999, XICCATO e coll., 2000). Nel caso di uno svezzamento più tardivo (25-28 giorni), l'effetto sul consumo di alimento è invece meno evidente e i conigli impiegano anche meno tempo per raggiungere un livello di consumi abbastanza stabile (figura 1).

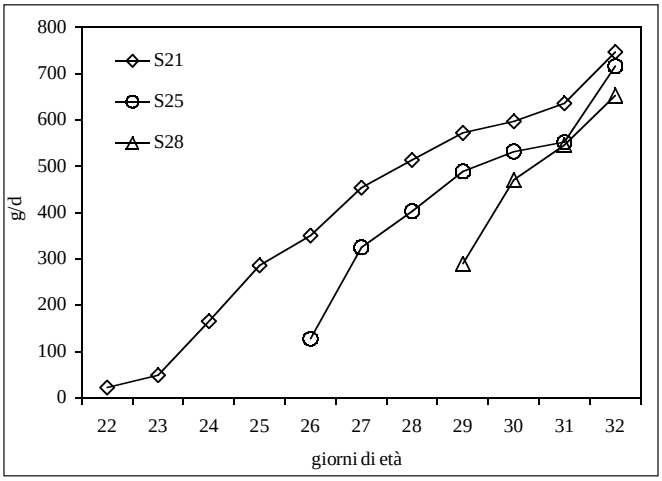


Figura 1. Evoluzione del consumo di alimento solido in conigli svezzati a 21 (S21), 25 (S25) e 28 (S28) giorni di età

Per ridurre lo stress dovuto alla brusca interruzione della lattazione, alcuni ricercatori hanno proposto uno svezzamento progressivo, sopprimendo le poppate a giorni alterni partendo dal 16° giorno e svezzando completamente a 23 giorni. Tale sistema, attuabile con particolari tipi di gabbie, avrebbe il vantaggio di ridurre in maniera graduale la produzione di latte, evitando il rischio di mastiti nelle coniglie.

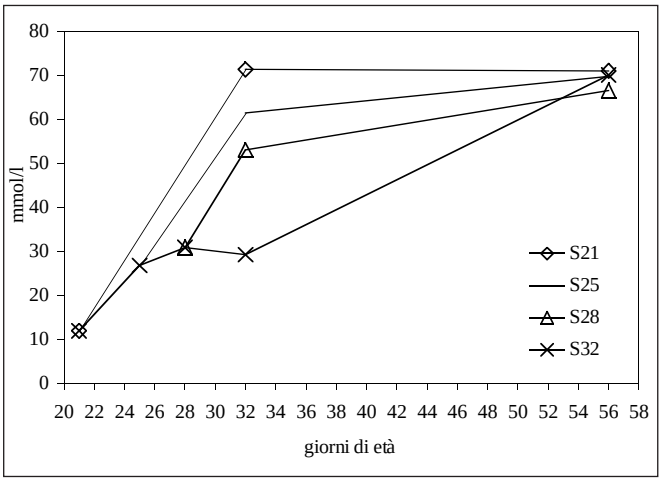


Figura 2. Contenuto di acidi grassi volatili a diverse età nel cieco di conigli svezzati a 21 (S21), 25 (S25), 28 (S28) e 32 (S32) giorni.

Come ultima opzione, lo svezzamento potrebbe essere gestito effettuando uno svezzamento precoce (21-25 giorni) dei coniglietti più pesanti e uno svezzamento tradizionale (28-35 giorni) dei coniglietti più leggeri. In questo caso, tuttavia, i coniglietti più pesanti, che sono anche quelli che verosimilmente hanno ingerito più latte, potrebbero risentire maggiormente del passaggio ad un'alimentazione esclusivamente solida.

Lo svezzamento precoce stimola lo sviluppo dell'apparato digestivo con un aumento dell'attività enzimatica digestiva e delle fermentazioni ciecali. A 32 giorni di età, la concentrazione di acidi grassi volatili nel cieco di conigli svezzati a 21 giorni raggiunge gli stessi livelli misurati a 56 giorni in conigli svezzati tradizionalmente (XICCATO e coll., 2003b) (figura 2), mentre vi sono ancora poche informazioni su come la mucosa intestinale e la microflora ciecale dei giovani conigli siano modificati dai fattori ontogenetici (età dell'animale) e dalla tecnica di svezzamento (GUTIÉRREZ e coll., 2002a).

Per quanto riguarda la dieta da svezzamento, nel caso di un'alimentazione comune madre-nidiata, di solito si cerca un compromesso tra i fabbisogni nutrizionali delle due categorie di animali. Le coniglie possono ricevere un mangime da lattazione, ad elevato contenuto di amido e limitato contenuto di fibra, fino a 18-21 giorni post partum. Successivamente, quando i coniglietti cominciano a ingerire significative quantità di alimento solido, il mangime da lattazione è sostituito da un mangime da svezzamento, in cui è aumentata l'inclusione di materie prime fibrose e ridotta quella dei cereali. Un'altra soluzione correntemente adottata è quella di impiegare un mangime unico per tutta la lattazione, in cui il livello di amido è ridotto, mentre la concentrazione energetica è mantenuta elevata grazie ad un'integrazione di grassi. Tuttavia, l'aumento del contenuto di grasso delle diete fino al 10% comporta una maggiore produzione di latte con possibili effetti negativi sulle condizioni corporee, soprattutto nelle fattrici più giovani (XICCATO, 1996).

Nel caso di uno svezzamento precoce, con alimentazione separata fattrice-nidiata, sono necessarie conoscenze più approfondite sulla fisiologia digestiva e i fabbisogni nutrizionali specifici dei coniglietti. Le informazioni bibliografiche disponibili non sono ancora sufficienti per poter dare indicazioni definitive sulla dieta starter ideale in queste condizioni (DE BLAS e coll., 1999).

Sembra utile approfondire le conoscenze relative al rapporto tra concentrazione energetica della dieta e ingestione giornaliera di energia alimentare e l'effetto di diete ad elevata concentrazione energetica, ottenute mediante l'addizione di grassi vegetali. L'impiego di un'elevata quantità di lipidi nelle diete starter è reso possibile dall'alta attività lipasica presente nei coniglietti allattanti. In alcuni studi, l'uso di una dieta starter appositamente formulata con grassi e latte in polvere ha aumentato il peso a 32 giorni di età in conigli svezzati precocemente, senza modificare l'andamento delle fermentazioni ciecali (XICCATO e coll., 2003b). Anche lo sviluppo del sistema immunitario dei coniglietti potrebbe essere modulato dalla quantità e qualità (rapporto acidi grassi polinsaturi n-3/n-6) dei lipidi (FORTUN-LAMOTHE e DROUET-VIARD, 2001). Secondo alcuni studi, inoltre, l'inclusione di grassi vegetali nella dieta peri-svezzamento rafforzerebbe l'effetto batteriostatico a livello gastrico espletato da alcuni acidi grassi a catena media.

Sulla base delle indicazioni correnti per uno svezzamento tradizionale e considerata la limitata attività amilasica intestinale dei giovani conigli, anche per i conigli svezzati precocemente si dovrebbe consigliare una dieta con una bassa concentrazione di amido e una più importante presenza di fibra (GIDENNE e FORTUN-LAMOTHE, 2002). Tuttavia, i risultati di GUTIÉRREZ e coll. (2002a) hanno evidenziato in coniglietti svezzati a 25 giorni una limitata capacita di ingerire e digerire diete fibrose dai 25 ai 39 giorni di età, ottenendo nello stesso periodo le migliori prestazioni produttive e la minore mortalità con una dieta con il 20% di amido e il 30% di NDF. In altre sperimentazioni, è stata dimostrata anche l'efficacia dell'aggiunta di enzimi (a-amilasi, xilanasi, b-glucanasi) o dell'impiego di un trattamento termico in diete per uno svezzamento precoce in termini di aumento della digeribilità dell'amido e della dieta e riduzione della mortalità nel periodo 25-39 giorni di età (GUTIÉRREZ e coll., 2002b).

Lo svezzamento precoce presuppone inoltre una migliore conoscenza dei fabbisogni proteici e aminoacidici dei conigli nelle prime fasi di accrescimento. La fonte proteica può modificare la digeribilità della dieta, con conseguenze sullo stato di salute dei conigli svezzati precocemente (GUTIERREZ e coll., 2001). In particolare, la f.e. di girasole è risultata più digeribile della f.e. di soia e, in prima istanza, più idonea all'alimentazione dei giovani coniglietti. Tuttavia, le informazioni ottenute non si possono ritenere conclusive e, prevedendo l'applicazione di uno svezzamento precoce, sarebbe interessante la messa a punto di programmi alimentari per fasi con una dieta starter dai 21-25 fino ai 35-42 giorni di età, una dieta da accrescimento dai 42 ai 55-60 giorni di età, ed una dieta da finissaggio fino alla macellazione.

L'applicazione di una corretta tecnica di svezzamento deve infine considerare anche i sistemi di stabulazione. Soprattutto in condizioni di svezzamento precoce, lasciare le nidiate in colonia nella gabbia materna piuttosto che spostare i coniglietti in gabbie individuali o bicellulari può contribuire a ridurre la mortalità e la suscettibilità alle malattie, influenzando al contempo il repertorio comportamentale e le condizioni di benessere dell'animale (MORISSE, 1998; VERGA, 2000). Proprio l'allevamento in colonia appare inevitabile nell'ingrasso dei conigli in allevamento commerciale, secondo quanto risulta dalle Raccomandazioni per il benessere del coniglio in allevamento in corso di preparazione da parte della Commissione Permanente della Convezione Europea per la Protezione degli Animali in Allevamento presso il Consiglio d'Europa.

In conclusione, e alla luce degli studi sopra riportati, lo svezzamento precoce delle nidiate risulta tecnicamente possibile, almeno a partire dai 21 giorni di età. Dal punto di vista operativo, la sopravvivenza delle nidiate è assicurata quando i coniglietti sono messi in condizione di individuare e raggiungere facilmente le fonti di acqua e di cibo. Le conseguenze

manageriali dell'impiego dello svezzamento precoce come normale pratica dell'allevamento sarebbero notevoli e comporterebbero una riorganizzazione, almeno parziale, dell'allevamento rispetto alla situazione attuale.

Dal punto di vista della coniglia, l'interruzione della lattazione dovuta allo svezzamento precoce deve essere considerata con attenzione per evitare la manifestazione di mastiti, soprattutto nelle coniglie pluripare ad elevata capacità lattifera, e/o un peggioramento delle prestazioni riproduttive (XICCATO e coll., 2003a). Per prolungare la carriera riproduttiva e migliorare le condizioni della fattrice, potrebbe essere consigliabile abbinare lo svezzamento precoce ad una inseminazione post-svezzamento (25 giorni) (CASTELLINI e coll., 2002). Nel complesso, le condizioni di benessere sia della nidiata che della fattrice dovrebbero essere migliorate, riducendosi le manifestazioni patologiche e la necessità di interventi sanitari.

Un limite all'applicazione dello svezzamento precoce potrebbe venire dalle nuove Raccomandazioni per il benessere dei conigli in allevamento. Sebbene in natura lo svezzamento della nidiata possa essere completato già a 24-25 giorni di età, nel caso frequente in cui la coniglia sia rimasta gravida subito dopo il parto, in allevamento la separazione anticipata della nidiata dalle fattrici potrebbe essere considerata poco rispettosa del benessere animale. In effetti, le Raccomandazioni in corso di preparazione riportano che l'età di svezzamento dei conigli non deve essere inferiore ai 28 giorni di età e, solo in caso di indicazione del veterinario, può essere ridotta a fino a 21 giorni. Ulteriori ricerche dovranno essere effettuate per verificare attentamente vantaggi e svantaggi di questa tecnica non solo sui risultati produttivi, ma anche sullo stato di benessere della nidiata e della fattrice.

BIBLIOGRAFIA

1) CHEEKE P. R. Rabbit Feeding and Nutrition. Academic Press, Orlando, FL. 1987.

2) DE BLAS J. C., GUTIÉRREZ I., CARABAÑO R. Destete precoz en gazapos. Situación actual y perspectivas. In *Avances en Nutrición Animal. XV Curso de Especilización FEDNA*. (ed. G. Rebollar, J. C. de Blas and G.M. Mateos). Ediciones Peninsular, Madrid, Spain. pp. 67-81. 1999.

3) DE BLAS J. C., PÉREZ E., FRAGA M. J., RODRIGUEZ J. M., GÁLVEZ J. F. Effect of diet on feed intake and growth in rabbits from weaning to slaughter at different ages and weights. *J. Anim. Sci.* 52, 1225-1232. 1981.

4) DOJANA M., COSTACHE M., DINISCHIOTU A. The activity of some digestive enzymes in domestic rabbits before and after weaning. *Anim. Sci.* 66, 501-507. 1998.

5) FORTUN-LAMOTHE L., DROUET-VIARD F. Alimentation et immunité. II -Etat des connaissances et perspectives de recherches pour le lapin. *Proc. 9èmes J. Rech. Cunicole*, 97-110. 2001.

6) FORTUN-LAMOTHE L., GIDENNE T., LAPANOUSE A., DE DAPPER J. Technical note: an original system to separately control litter and female feed intake without modification of the mother-young relations. *World Rabbit Sci*. 8, 177-180. 2000.

7) GIDENNE T. Nutritional and ontogenetic factors affecting rabbit caeco-colic digestive physiology. In *Proc. 6th World Rabbit Congress*, volume 1, pp. 13-28. 1996.

8) GIDENNE T., FORTUN-LAMOTHE L. Feeding strategies for young rabbits around weaning: a review of digestive capacity and nutritional needs. *Animal Sci.* 75, 169-184. 2002.

9) GUTIÉRREZ I., ESPINOSA A., GARCÍA J., CARABAÑO R., de Blas J. C. Effect of levels of starch, fiber, and lactose on digestion and growth performance of early weaned rabbits. *J. Anim. Sci.* 80, 1029-1037. 2002a.

10) GUTIÉRREZ I., ESPINOSA A., GARCÍA J., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. Effects of starch and protein sources, heat processing, and exogenous enzymes in starter diets for early weaned rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.* 98, 175-186. 2002b.

11) GUTIÉRREZ J. ESPINOSA A., CARABAÑO R., DE BLAS J.C. Alimentacion de gazapos destetados precozmente. II. Effect of type of vegetable protein on growth and mortality of early weaned rabbits. *Proc. ASESCU*, Spain. 2001.

12) LEBAS F. Amélioration de la viabilité des lapereaux en engraissement par un sevrage tardif. Cuniculture 20(2), 73-75. 1993.

13) LEBAS F., GIDENNE T., PEREZ J. M., LICOIS D. Nutrition and pathology. In *The Nutrition of the Rabbit* (ed. J. C. de Blas and J. Wiseman), CABI Publishing, CAB International, Wallingford, Oxon, UK. pp. 197-213. 1998.

14) LEBAS F., Maitre I. Alimentation de presevrage. *Cuniculture* 16(3), 135-140. 1989.

15) MAERTENS L. Rabbit nutrition and feeding: a review of some recent developments. *J. Appl. Rabbit Res*. 15, 889-913. 1992.

16) MORISSE J. P. Factors affecting susceptibility of rabbit litters to enteritis. *J. Appl. Rabbit Res*. 10, 106-110. 1987.

17) MORISSE J.P. Le bien être chez le lapin: rapport de synthèse. *Proc. 7èmes Journées de la Recherche Cunicole*, 13-14 Mai, Lyon, France, 205-214. 1998.

18) PADILHA M. T. S., Licois D., Gidenne T., Carré B., Fonty G. Relationships between microflora and caecal fermentation in rabbits before and after weaning. *Reprod. Nutr. Develop*. 35, 373-386. 1995.

19) PEREZ J. M., GIDENNE T., BOUVAREL I., ARVEUX P., BOURDILLON A., BRIENS C., Le Naour J., Messager B., Mirabito L. Apports de cellulose dans l'alimentation du lapin en croissance. II. Conséquences sur les performances et la mortalité. *Ann. Zootec.* 45, 299-309. 1996.

20) PIATTONI F., MAERTENS L. Effect of weaning age and solid feed distribution before weaning on the caecal fermentation pattern of young rabbits. Proc. Arbeitstagung über Krankheiten der Kaninchen, Pelztiere und Heimtiere. Ed. *Deutschen Vet. Med. Gesellschaft e. V.*, Giessen, Germany. pp. 97-105. 1999.

21) PIATTONI F., MAERTENS L., DEMEYER D. Age dependent variation of caecal contents composition of young rabbits. *Arch. Anim. Nutr*. 48, 347-355. 1995.

22) REMOIS G., LAFARGUE-HAURET P., BOURDILLON A., ROUILLERE H. Effect of weaning weight on growth performance of rabbits. *Proc. 6th World Rabbit Congress*, volume 3, pp. 237-240. 1996.

23) SZENDRO ZS. The nutritional status of foetuses and suckling rabbits and its effects on their subsequent productivity: a review. *Proc.7th World Rabbit Congress*, volume B, pp. 375-393. 2000.

24) VERGA M., 2000. Intensive rabbit breeding and welfare: development of research, trends and applications. Proc. 7th World Rabbit Congress, volume B, pp. 491-509.

25) XICCATO G., 1996. Nutrition of lactating does. Proc. 6th World Rabbit Congress, volume 1, pp. 29-47.

26) XICCATO G., TROCINO A., SARTORI A., QUEAQUE P.I. Early weaning of rabbits: effect of age and diet on weaning and post-weaning performance. *Proc. 7th World Rabbit Congress*, volume C, pp. 483-490. 2000.

27) XICCATO G., TROCINO A., SARTORI A., QUEAQUE P.I. Effect of parity order and litter weaning age on the performance and body energy balance of rabbit does. *Livest. Prod. Sci.* (in stampa). 2003a.

28) XICCATO G., TROCINO A., SARTORI A., QUEAQUE P. I. Effect of starter diet and weaning age on growth, body composition and caecal fermentation of young rabbits. *Anim. Sci.* (in stampa). 2003b.

BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLA RIPRODUZIONE IN UNA MODERNA CONIGLICOLTURA: ACQUISIZIONI E ASPETTI PRATICI

URBAN BESENFELDER

Institute for Animal Breeding and Genetics, Veterinaerplatz 1, A-1210 Vienna, Austria

Nel coniglio, come in altre specie zootecniche, le biotecnologie della riproduzione risultano di grande importanza sia scientifica che applicativa. Molte sono ormai di uso tra gli allevatori, come l'inseminazione artificiale; altre, in seguito a progressi realizzati sulle conoscenze della fisiologia della riproduzione, hanno reso possibile il recupero degli oociti e degli embrioni, la crioconservazione, l'iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi, il trasferimento dei nuclei, il controllo del rapporto fra i sessi e l'embryo transfer. Inoltre le informazioni genetiche hanno fornito la possibilità di trasferire geni additivi e di ricombinare geni omologhi offrendo nuove possibilità per modificare il genoma di organismi più complessi. La possibilità di raccogliere e trasferire embrioni di mammiferi prima dell'impianto ha portato a molteplici applicazioni legate alla genetica molecolare, alla biologia cellulare e alla riproduzione.

Embryo-transfer

L'embryo transfer si basa sul prelievo di oociti o di embrioni da femmine donatrici e il loro trasferimento in femmine riceventi Nella femmina donatrice deve essere provocata una superovulazione per ottenere un numero di embrioni e di oociti al di sopra della norma. Attualmente la superovulazione viene provocata di routine con FSH o PMSG a dosi ed intervalli diversi. L'induzione della ovulazione viene poi indotta con hCG, LH o GnRH. Dopo l'induzione della ovulazione, contemporanea all'I. A., si deve tenere in attenta considerazione l'ordine fisiologico degli eventi. L'ovulazione si verifica 9,5 – 13 ore dopo l'I. A. e la rimozione degli oociti non fecondati si può effettuare 12 – 15 ore dopo l'I. A. Circa 2 ore dopo l'ovulazione l'oocita ha percorso circa la metà dell'ovidutto e 18 ore post-coito circa la metà degli embrioni sono entrati nell'istmo; dopo 24 ore tutti gli embrioni si possono ritrovare nell'istmo. La prima divisione cellulare dell'embrione si verifica 26 ore dopo la I.A. e le successive avvengono nel seguente ordine: 26-32 ore, 4 cellule; 32-40 ore, 8 cellule; 40-47 ore, morula; 68-72 ore, blastocita.

Dopo 78 ore dal coito circa 1/3 degli embrioni si trovano oltre la giunzione utero-tubale mentre a 84 ore circa il 90% degli stessi si trovano a livello di corna uterine. L'impianto è stato riscontrato tra 120 e 144 ore post-coito. Considerando la suddetta cronologia di eventi sono state messe a punto varie tecniche per raccogliere embrioni nei diversi stadi e siti. Il prelievo post-mortem si applica quando non interessa mantenere in vita la femmina; se invece si opera su animali di elevato valore genetico, si preferisce ricorrere alla tecnica endoscopica.

Il lavaggio degli embrioni (flushing) dopo la morte degli animali rappresenta una tappa finale. Dopo la rimozione e la preparazione degli organi riproduttivi, l'ovidutto e le corna uterine devono essere lavate. Il flushing mediante intervento chirurgico mira invece alla raccolta degli embrioni nell'animale in vita.

Un metodo meno invasivo consiste nell'applicazione di prostaglandine cui consegue il passaggio degli embrioni dalle tube e dall'utero alla vagina dove possono essere recuperati mediante flushing. La laparoscopia sembra comunque il metodo più impiegato per il prelie-

vo, consentendo di accedere e manipolare il materiale attraverso piccole cavità d'ingresso nel peritineo: la tecnica si basa nell'inserzione di un catetere venoso nell'ampolla via-infundibolo e flushing delle tube con 5-20 ml di liquido. La tecnica prescelta dipende dagli scopi (scientifici o commerciali).

Il primo embryo transfer (1991) è stato eseguito con embrioni prelevati 64-66 ore dopo la I.A. e trasferiti nelle corna uterine di coniglie sincronizzate; in prove successive gli embrioni sono stati introdotti nelle ampolle, via infundibolo, in coniglie anestetizzate, sotto la guida di un laparoscopio. I trasferimenti si sono tradotti nell'86% di gravidanze e nel 47% di sopravvivenza embrionale.

Produzione *in vivo*-coltura *in vitro*

Una tecnica meno utilizzata e più complessa è rappresentata dalla produzione *in vivo* degli embrioni. Lo stato di maturazione viene conseguito in vitro. Dopo stimolazione della crescita follicolare mediante PMSG e induzione dell'ovulazione mediante GnRH, LH o hCG si può raccogliere l'oocita prima dell'ovulazione o dopo dall'ovidutto. Il successivo accrescimento *in vitro* è una fase molto delicata essendo numerosi i fattori che influiscono sulla maturazione sincronizzata del cumulo cellulare, dell'ooplasma e del nucleo. La fecondazione *in vitro* è stata eseguita rimuovendo gli oociti dai follicoli o dalla superficie dell'ovaio e inseminandoli. La riuscita nei due casi è stata pari al 49.5% e al 73.5%, rispettivamente. Anche in oociti crioconservati il grado di fecondazione è risultato molto buono (74%): La coltura *in vitro* risponde bene fino allo stadio di morula o blastocista mentre l'impianto è molto difficile perché non si riesce a supplire alla mancanza di mucina prodotta durante il passaggio nell'ovidutto.

Oltre alla produzione degli embrioni, la coltura in vitro consente l'uso di spermatozoi selezionati come nella iniezione intracitoplasmatica di spermatozoi. I motivi della sua applicazione sono legati ad alcuni fattori quali le malattie genetiche legate al sesso, le differenze nelle performance metaboliche e di accrescimento, ed un rapporto ottimale dei sessi per una efficiente produzione animale. Gli spermatozoi selezionati con la tecnica della cito-fluorimetria, possono essere impiegati con successo per la fecondazione *in vitro* di oociti (57% di fecondazione). La microiniezione di spermatozoi negli oociti supera il problema della penetrazione nell'ooplasma perché non richiede la reazione acrosomiale; quindi non rivestono grande importanza la motilità e la vitalità degli stessi, che possono essere prelevati dalla coda dell'epididimo o dal seme eiaculato. Sia con la iniezione subzonale che intracitoplasmatica sono stati ottenuti più elevati ritmi di fecondazione che usando per la iniezione spermatozoi capacitati.

Congelamento del seme e degli embrioni

La possibilità di crioconservare gameti ed embrioni consente di costituire una banca di genomi. Sia per il seme che per gli embrioni si possono utilizzare i crioconservanti a basso peso molecolare e permanenti, o quelli a basso peso molecolare non permanenti o ancora alto peso molecolare non permanenti. Per il congelamenti lento si utilizza generalmente un solo crioprotettore. Gli effetti sinergici che i crioprotettori esplicano nei processi di disidratazione e nella prevenzione della formazione di cristalli di ghiaccio consente di ridurre la temperatura di congelamento delle cellule aumentando così il tempo di equilibrazione richiesto al raggiungimento del massimo ritmo di raffredamento.

Clonazione

Tra le biotecnologie con maggiori potenzialità vi è la clonazione. Sono varie le tecniche di trasferimento nucleare (NT) quali la fusione indotta dai virus o dal laser, la microiniezione ed elettrofusione; le ultime due sono le più usate. Il materiale da utilizzare può provenire da embrioni, feti o adulti come viene specificato di seguito:

- embrioni allo stadio di
  8 cellule
  32 cellule
  blastocisti
  cellule embrionali
- feti
  fibroblasti
  cellule gonadiche
- adulti
  fibroblasti

Gli oociti che riceveranno il nucleo devono essere attivati artificialmente per simulare la penetrazione dello spermatozoo; può essere indotta con corrente elettrica, o con etanolo o calcio ionoforo. Se l'attivazione non è adeguata lo sviluppo si attua per partenogenesi, ma poi si arresta.

Trasferimento di geni

La produzione di animali transgenici è stata segnalata per la prima volta circa 15 anni fa. Il trasferimento fu attuato mediante microiniezioni di frammenti di DNA nei pronuclei di oociti fecondati. La sua applicazione in questo campo non ha dato riscontri positivi, considerando il basso numero di animali ottenibili. Recentemente è iniziata una nuova era nella tecnologia transgenica grazie all'uso di vettori virali e alla trasformazione di linee di cellule somatiche con trasferimento del nucleo o di geni dallo spermatozoo.Si può procedere come segue:

- clonazione della struttura genica
- preparazione della soluzione di DNA per la microiniezione
- raccolta degli zigoti
- microiniezione nei pronuclei di oociti fecondati
- trasferimento degli embrioni iniettati
- individuazione del transgene nei conigli nati
- formazione di linee transgeniche che portino il transgene nel loro patrimonio ereditario
- esame dell'espressione e dell'attività biologica del transgene.

Gli embrioni per la microiniezione devono essere prelevati 19-21 h dopo la inseminazione.

Gli stessi possono essere conservati e coltivati in vitro sia prima che dopo la manipolazione. Gli zigoti di buona qualità non presentano il cumulo di cellule ed hanno un citoplasma brillante.

Circa l'80-90% sono idonei per la microiniezione. Si preferisce effettuare l'embryo-transfer per laparascopia anziché per via chirugica.

Nei mammiferi i risultati del trasferimento vengono misurati come: efficienza (embrioni transgenici/embrioni iniettati trasferiti); frequenza di integrazione transgenica (embrioni transgenici/numero di coniglietti nati) e ritmo di sopravvivenza (animali nati/embrioni trasferiti). I valori realizzati sono i seguenti: 1-2% efficienza; 8-12% frequenza di integrazione,

10-15% ritmo di sopravvivenza. Un prerequisito per costituire delle linee trasgeniche è la conservazione delle cellule germinali del primo coniglio (fondatore). Le attuali applicazioni del trasferimento di geni sono le seguenti:

- coltivazione di geni (ghiandola mammaria/sistema sanguigno) per la produzione di farmaci per uso umano e veterinario, nonché per la produzione di enzimi
- modelli animali per le malattie dell'uomo (aterosclerosi, tumori ed infezioni virali)
- miglioramento delle prestazioni e della qualità delle produzioni (produzione carne e performance di crescita).

Nonostante gli ovvii vantaggi dei conigli transgenici per la ingegneria genetica e come modelli per malattie, alcuni problemi devono essere ancora risolti. Lo sviluppo delle tecniche di trasferimento nucleare fornirà impulsi nuovi sia perché consentono di trasferire geni additivi e la ricombinazione omologa sia perché ridurrà alcuni problemi quali la bassa efficienza, la non-espressione di transgeni o di mutazioni inserzionali.

Conclusioni

L'uso delle biotecnologie amplierà il campo delle conoscenze sulla riproduzione del coniglio rendendo possibile la loro applicazione pratica. Le possibilità offerte sono così legate alla conservazione di individui, linee o razze, alla introduzione di nuovo materiale genetico, all'ottenimento di gameti o embrioni utilizzabili per altre tecniche. Sulla base delle informazioni molecolari si cominciano appena a comprendere l'attività dei geni, le loro interazioni, l'introduzione o la perdita di informazione genetica, e la totipotenza/pluripotenza delle cellule, compreso il meccanismo di differenziazione e la sua reversibilità. Nel loro insieme le diverse tecnologie potranno essere di valido aiuto per l'agricoltura e la medicina.

TECNICHE DI INSEMINAZIONE ARTIFICIALE E PROBLEMATICHE DI CAMPO

BENIAMINO SETTA

Gruppo Martini, Budrio di Longiano (Forlì)

L'Inseminazione Artificiale (IA) in coniglicoltura ha assunto una dimensione industriale solo nell'ultimo decennio con la diffusione della gestione ciclizzata dell'allevamento, che prevede la formazione di gruppi di soggetti nella stessa fase fisiologica e l'esecuzione delle operazioni di allevamento in giorni fissi della settimana.

I vantaggi della IA possono essere sintetizzati come segue.

• Igienico sanitari
- mancato contatto fisico degli animali durante l'accoppiamento;
- rimonta dei riproduttori con introduzione di materiale seminale anziché di animali;
- possibilità di effettuare la produzione ciclizzata, con vuoti sanitari periodici.

• Manageriali
- migliore organizzazione del lavoro, delle produzioni, del trasporto e della commercializzazione;
- migliore organizzazione-esecuzione dei programmi di alimentazione, profilassi e terapia;
- più semplice raccolta dei dati.

• Economici
- diminuzione dei tempi di lavoro e dei costi;
- diminuzione del numero di maschi;
- aumento del numero delle fattrici produttive;
- aumento del fatturato globale/addetto;
- maggior produzione in momenti di mercato favorevole.

• Selezione e miglioramento genetico
- più facile individuazione dei buoni riproduttori e dei caratteri da selezionare;
- più agevole e preciso testaggio dei riproduttori;
- più facile attuazione dei programmi di incrocio;
- possibilità di conservazione del patrimonio genetico nel tempo.

Il successo della IA dipende da fattori legati al maschio, alla femmina e alla tecnologia di condizionamento del seme.

Le prestazioni riproduttive, espresse in termini di recettività al maschio, fecondità e fertilità, nelle nullipare sono generalmente buone, mentre nelle primipare risultano meno soddisfacenti, specialmente se queste vengono inseminate durante la lattazione; nelle pluripare presentano caratteristiche intermedie. Le cause di queste differenze vanno ricercate nell'antagonismo esistente tra lattazione e riproduzione e nel cospicuo deficit energetico che si verifica nelle primipare contemporaneamente gestanti e lattanti, dovendo le medesime completare il proprio sviluppo e nel contempo coprire gli ingenti fabbisogni per la produzione di latte e lo sviluppo del feto.

Da un punto di vista pratico l'inseminazione artificiale si esegue introducendo profondamente in vagina il materiale seminale a mezzo di una pipetta di vetro, previamente lavata e

sterilizzata, lunga circa 25 cm, con una punta leggermente ricurva e smussata. Per ogni fattrice da fecondare deve essere usata una cannula, che se di vetro, deve essere sterilizzata prima del successivo impiego. E' per questo che molti preferiscono le cannucce in PVC (usa e getta), anche se più costose. Purtroppo sono pochissimi gli allevatori che seguono un protocollo serio per la pulizia di questo delicato materiale.

Al momento dell'inseminazione l'operatore afferra la coda della coniglia con l'indice e il pollice della mano sinistra sollevandola leggermente. Con il pollice della stessa mano spinge verso il basso ed allarga l'apertura vulvare, facilitando l'introduzione della pipetta, che va indirizzata con l'incurvatura verso il dorso dell'animale. Dopo alcuni centimetri, il contatto con il meato urinario ostacola l'avanzamento della pipetta, per cui è necessaria una sua rotazione di circa 180°, per evitare l'introduzione della stessa in uretra. Superato tale ostacolo, la pipetta può essere introdotta per un totale di 18-20 cm, al fine di realizzare un'inseminazione cervicale profonda. Per l'inoculazione si utilizza una siringa collegata ad un tubicino di gomma. La coniglia può essere tenuta in posizione verticale appoggiata sul piano superiore della gabbia, oppure mantenuta tra le gambe o infine inserita in una particolare struttura "a tubo"; non sono state osservate differenze significative tra i tre metodi.

La dose da inoculare è generalmente pari a 0,5 ml di materiale seminale diluito.

Vista la particolare fisiologia riproduttiva della coniglia, mancando lo stimolo del coito necessario per innescare il meccanismo neuro-ormonale responsabile della ovulazione, nel caso di IA, si deve ricorrere ad un trattamento ormonale con GnRH o analoghi al momento dell'inseminazione o qualche ora prima.

Entro 90-120 min dall'iniezione si ottiene un picco di LH che provoca la deiscenza dei follicoli nel giro di 9-13 ore. Il trattamento determina anche, 14-16 ore dopo, quel picco di FSH necessario per la maturazione di nuovi follicoli, che a loro volta produrranno l'estrogeno indispensabile per il normale funzionamento del corpo luteo.

L'applicazione della IA richiede attrezzature e materiale idonei. Disponendo di una sola persona è necessario un apposito tavolinetto collocato all'interno di un capannone ben illuminato. Un operatore esperto riesce ad inseminare 60-100 coniglie all'ora, anche per più ore di seguito.

Oltre all'impiego del GnRH possono essere praticati altri trattamenti ormonali con diverse finalità. Per la sincronizzazione dell'estro si somministrano ormoni 2-3 giorni prima della IA al fine di stimolare lo sviluppo e la maturazione dei follicoli. I prodotti maggiormente usati sono la PMSG e le prostaglandine. I due prodotti vengono utilizzati singolarmente nell'80% degli allevamenti, mentre nel restante 20% vengono abbinati.

La PMSG è una glicoproteina ad azione follicolostimolante e luteinizzante prodotta dalle cellule trofoblastiche dell'endometrio, con un alto contenuto di acido sialico che ne aumenta l'emivita.

Attualmente il protocollo più comune prevede una iniezione intramuscolare (media 20 UI; min-max 8-25UI) 48-72 ore prima della I.A, in grado di migliorare sensibilmente le prestazioni delle fattrici lattanti non recettive, che restano comunque inferiori a quelle delle non lattanti, perché non si riesce ad eliminare completamente l'effetto negativo della prolattina. É stato inoltre evidenziato che trattamenti ripetuti e ravvicinati con PMSG provocano in molte coniglie una reazione immunitaria, influenzata dal ritmo di somministrazione e dalla dose di impiego. Altre conseguenze negative sono rappresentate dalla eccessiva iperemia del tratto genitale, dal notevole aumento del peso delle ovaie e dalla presenza di numerosi follicoli emorragici. Anche la qualità degli embrioni e la loro capacità di sviluppo in vitro risultano compromessi. In fattrici trattate ripetutamente è stata riscontrata una mortalità perinatale più alta ed un numero più elevato di nidiate a rischio (<5 e > 12 redi). Tenuto conto di tali controindicazioni, ma anche del fatto che la PMSG resta ancora l'ormone più utilizzato, si

consigliano alcuni accorgimenti: usare 20 UI; associarla con altri prodotti a minor rischio di risposta immunitaria; limitarne l'impiego nei periodi stagionali più critici e destinarla solo alle fattrici che hanno problemi o che producono nidiate poco numerose. É infatti sconsigliabile trattare le nullipare la cui fertilità è buona e le primipare per le quali conviene applicare un ritmo meno intensivo, considerate le difficoltà che si incontrano per coprire i loro elevati fabbisogni energetici; evitare categoricamente due interventi successivi in coniglie rimaste vuote alla IA e che non hanno quindi partorito.

Al fine di ridurre il numero di trattamenti che una fattrice riceve nel corso della sua carriera riproduttiva, è stato proposto un protocollo "differenziato" che tiene conto dello stato di recettività al momento dell'inseminazione: le femmine recettive vengono inseminate senza alcuna sincronizzazione, mentre le altre vengono trattate con PMSG ed inseminate 3 giorni più tardi. Il problema di questo protocollo consiste nella difficoltà di adattarlo alla ciclizzazione produttiva, che prevede l'inseminazione un solo giorno alla settimana.

Le prostaglandine sono sostanze (naturali o sintetiche) che possono essere utilizzate anche per la sincronizzazione degli estri. La PGF_{2a} inoculata 72 ore prima della IA , in alcune condizioni di corpo luteo persistente, determina un aumento della fertilità.

Tale prodotto ha un costo più basso della PMSG, non provoca reazioni immunitarie ed ha un'emivita più breve. L'unico inconveniente è che il suo effetto dipende in maggior misura dalla situazione ovarica ed ormonale al momento della somministrazione, che modula il suo meccanismo d'azione e quindi la risposta della fattrice.

Le prostaglandine vengono comunque utilizzate soprattutto per la interruzione della pseudo-gravidanza e per la sincronizzazione dei parti. Il primo obiettivo si raggiunge trattando le coniglie risultate negative alla palpazione con 200 mg di PGF_{2a}; così facendo è possibile ridurre di 3-4 giorni il periodo di pseudogestazione e anticipare di una settimana (dal 21° al 14° giorno) il nuovo intervento di IA Per la sincronizzazione dei parti vengono invece iniettate al 29°-30° giorno di gravidanza e inducono il parto entro 24-48 ore dalla somministrazione, lasciando alla coniglia il tempo di preparare il nido. Ciò non si verifica con l'ossitocina che determina parti affrettati, con forte riduzione dell'istinto materno e della capacità di allattamento. La prostaglandina migliora inoltre la recettività sessuale 6-8 giorni dopo il parto.

Alcuni allevatori utilizzano dei principi fitoterapici che vengono somministrati nell'acqua di bevanda 3 giorni prima dell'inseminazione artificiale. La diffusione di questa pratica, spesso associata al salto della poppata, è in aumento e i risultati sono soddisfacenti fatto salvo l'inconveniente della possibile ostruzione delle condutture dell'acqua di abbeveraggio.

Una nuova strategia è rappresentata dalla somministrazione per via sottocutanea di b-carotene 72 ore prima della FA. Il costo dell'intervento è più elevato rispetto a quello delle gonadotropine, ma scongiura il rischio di una risposta anticorpale.

Attualmente si sta diffondendo la tendenza a ricorrere a biostimolazioni per la sincronizzazione degli estri, in alternativa agli ormoni; ciò al fine di conservare un'immagine naturale alla carne di coniglio e di rispettare le direttive della politica comunitaria in tema di residui farmacologici nelle carni e di benessere animale. Le tecniche più impiegate sono: cambiamento di gabbia poco prima della IA ; variazioni del fotoperiodo (durata, alternanza, etc.); momentanea separazione della madre dalla nidiata; flushing. La preclusione dell'accesso al nido per 24-48 ore prima della IA ha migliorato la recettività, sfruttando la caduta del picco di prolattina che si verifica immediatamente dopo la suzione. Il flushing, basato sulla somministrazione, nei 15 giorni che precedono la IA , di un mangime ricco di energia e proteine, non ha invece fornito risultati univoci.

Tutte le biostimolazioni sono comunque da considerare per il momento a livello sperimentale.

Un'ultima strategia che può comportare un miglioramento dell'efficienza riproduttiva delle fattrici è basata sulla scelta di un adeguato ritmo riproduttivo. Va tenuto conto al riguardo che la coniglia è molto recettiva subito dopo il parto e potrebbe quindi essere accoppiata o inseminata con successo in questo momento. Non va però dimenticato che l'intensa selezione operata per aumentare la prolificità e la produzione di latte ha notevolmente incrementato l'output energetico, rendendo di fatto impraticabile la piena sovrapposizione lattazione – gravidanza che porta ad una riduzione della fertilità e della prolificità, e ad un incremento del tasso di rimonta. Il ritmo attualmente più utilizzato è quello semi-intensivo, con accoppiamento o IA 10-12 giorni dopo il parto, che sembra rappresentare un buon compromesso tra economicità dell'impresa ed esigenze fisiologiche delle fattrici.

FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DEL CONIGLIO MASCHIO

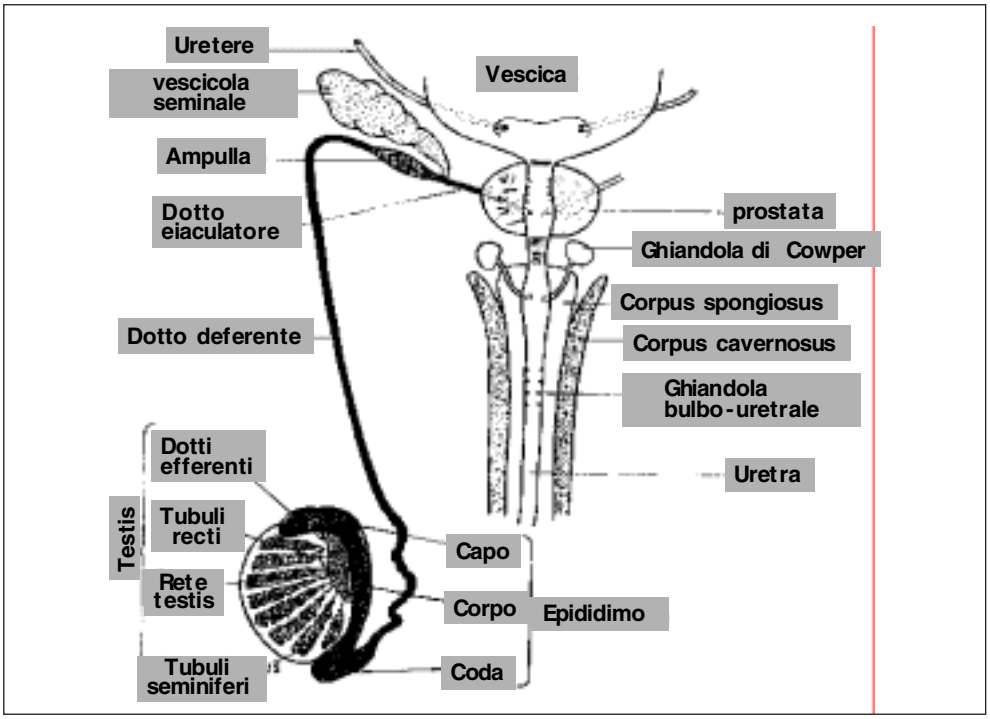
MAURIZIO MONACI

Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria -
Università degli Studi di Perugia

L'apparato genitale maschile è costituito dai testicoli, dalle vie genitali, dalle ghiandole accessorie e dall'organo copulatore.

I testicoli, nell'animale pubere, sono voluminosi (1,5-2 g), ovoidali e molto allungati (3-3,5 x 1-1,5 cm); durante l'accoppiamento appaiono tumefatti e sporgenti.

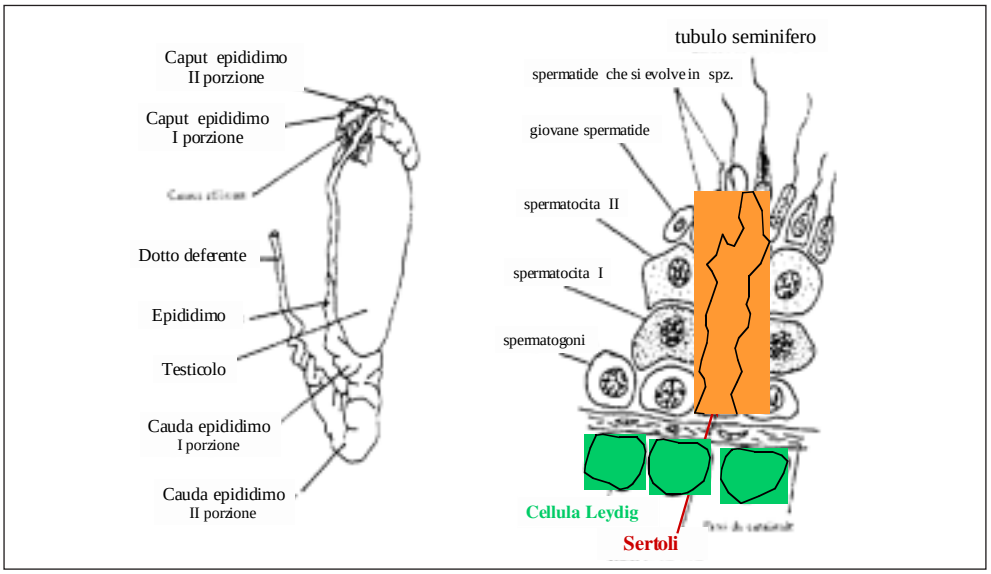
Alla nascita sono situati nella cavità addominale e discendono nella borsa scrotale verso i 2 mesi di età. Successivamente possono risalirvi (riposo sessuale, stress) per poi ridiscendere,



grazie all'azione del muscolo cremastere (specie alternativamente esorchide o enorchide).

I testicoli sono divisi in logge monolobulari contenenti i tubuli seminiferi, nel cui epitelio sono localizzate le cellule del Sertoli e le cellule germinali. Le prime, oltre a costituire una matrice di sostegno per le seconde, forniscono le sostanze nutritive necessarie per la loro differenziazione e moltiplicazione. Il tessuto interstiziale è invece formato dalle cellule di Leydig che sono adibite alla biosintesi e secrezione degli steroidi androgeni, indispensabili per il normale svolgimento della spermatogenesi.

I tubuli seminiferi sono dapprima contorti, assumono poi un andamento rettilineo e van-



no infine a formare la *rete testis* con sbocco nei canalicoli efferenti.

Le vie genitali iniziano all'interno del testicolo con i tubuli retti e proseguono con l'epididimo, che è molto voluminoso e aderisce alla gonade con la testa e il corpo, mentre la coda se ne distacca collegandosi al fondo del sacco scrotale. La coda è il sito di deposito degli spermatozoi. Fa seguito il canale deferente lungo 12-15 cm e relativamente ispessito. Molto flessuoso a livello del testicolo, dopo un decorso in direzione craniale descrive una curva ad uncino per contornare l'uretere e portarsi caudalmente al disopra del collo della vescica. Qui si dilata in una espansione o ampolla, lunga 2 cm, che scorre sotto la vescichetta seminale e si apre nella sua parte caudale, entrando in comunicazione con l'uretra attraverso il condotto eiaculatore.

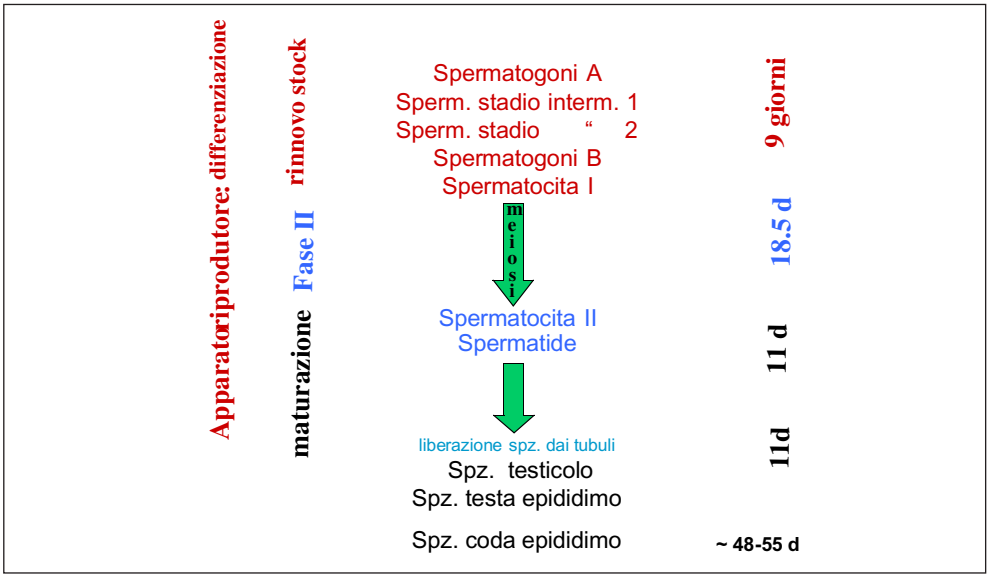
Le ghiandole annesse, responsabili della produzione del plasma seminale, sono:

- vescicola seminale, impari, è situata dorsalmente al collo della vescica e alle ampolle dei deferenti. Appiattita dorso-ventralmente e lunga circa 2,5 cm è ricoperta, nei suoi 2/3 caudali, dalla ghiandola vescicolare e dalla prostata. Caudalmente si restringe in una specie di collo che riceve i dotti deferenti, prima di sboccare nell'uretra.
- Prostata, costituita da un complesso di ghiandole: ghiandola vescicolare o prostata craniale, prostata propriamente detta o prostata caudale, ghiandole paraprostatiche.
- La ghiandola vescicolare copre la maggior parte della faccia dorsale della vescichetta seminale e delle ampolle. La sua faccia dorsale è coperta caudalmente dalla prostata propriamente detta. Le ghiandole paraprostatiche, piccole e arrotondate, sono situate ai due lati dell'uretra, a livello della terminazione dei dotti deferenti, ventralmente alla prostata.
- Ghiandola bulbo-uretrale o di Cowper, è unita a quella del lato opposto a formare una voluminosa massa bilobata che si apre, mediante 2 coppie di canali, nell'uretra carvernosa.

Il pene, praticamente sprovvisto di glande, in condizioni di riposo è diretto obliquamente all'indietro ed è racchiuso in una duplicatura cutanea (guaina). Durante l'erezione assume una posizione orizzontale ed è diretto in avanti. Misura circa 8 cm di cui 4-5 appartengono alla parte fissa.

Dietro l'organo copulatore sono situate due ghiandole prepuziali che secernono una sostanza dall'odore penetrante, che stimola il riflesso ovulatorio.

La successione delle fasi che dalla cellula madre, o spermatogonio, conducono ad uno



spermatozoo maturo prende il nome di spermatogenesi e comprende 2 tappe successive: la fase di elaborazione, corrispondente al ciclo spermatogenico, e la fase di maturazione a livello dell'epididimo.

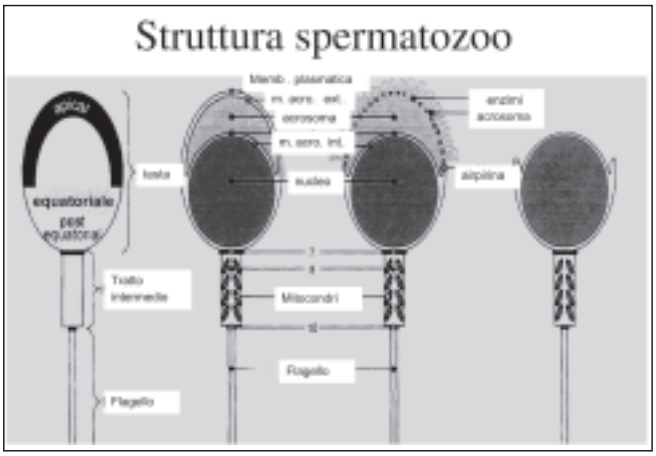
Alla nascita l'animale possiede uno stock di cellule madri diploidi o spermatogoni; nei tubuli seminiferi essi andranno incontro ad una serie di divisioni e differenziazioni, che si susseguono in cicli e conducono da uno spermatogonio a 16 spermatociti di secondo ordine, che si trasformeranno in spermatidi e spermatozoi chiudendo il ciclo. Gli spermatozoi così ottenuti vengono liberati nel lume del tubulo seminifero e migrano nei canali efferenti.

Per ottenere da uno spermatogonio uno spermatozoo epididimale (testa) occorrono da 45 a 55 giorni. Il transito dalla testa alla coda, facilitato dalle contrazioni delle vie efferenti indotte dal testosterone, dura da 8 a 10 d e durante questo periodo gli spermatozoi subiscono una fase di maturazione con modifiche a livello dell'acrosoma e del rivestimento glicoproteico: migrazione e riassorbimento della goccia citoplasmatica presente nella parte prossimale della zona intermedia, disidratazione, perdita di lipoproteine da parte della membrana plasmatica; adesione di proteine provenienti dalle secrezioni dell'epitelio seminifero; modifiche metaboliche a carico delle desossiribonucleine e dei lipidi. Il nuovo assetto è responsabile della comparsa delle proprietà agglutinanti dello sperma nonché dello sviluppo della sua attitudine fertilizzante e della capacità di riconoscere l'ovulo.

Quando gli spermatozoi entrano nell'epididimo sono immobili, via via che progrediscono cominciano a spostarsi autonomamente percorrendo circonferenze sempre più ampie; quando hanno raggiunto la coda presentano movimenti di progressione rettilinea.

Lo spermatozoo maturo è costituito da una testa e una coda. La testa contiene l'acrosoma, che occupa i 2/3 anteriori, e il nucleo; l'acrosoma è costituito da glico-proteine e da enzimi lisosomiali che intervengono nella penetrazione e fecondazione dell'ovulo. La coda è a sua volta formata da: collo, parte intermedia e flagello. La parte intermedia contiene i mitocondri, che producono l'energia necessaria al movimento del flagello.

La produzione giornaliera di spermatozoi si attesta sui 250 milioni, ma circa il 30% viene riassorbito durante il tragitto e lo stoccaggio, mentre il 20% viene eliminato con l'urina. Questa riduzione numerica è dettata da leggi biologiche perché lo spermatozoo che giunge



all'ovulo deve essere perfettamente integro ed efficiente.

La quantità di seme prodotto dipende da numerosi fattori (individuo, età, fotoperiodo, temperatura, alimentazione, stress, farmaci) ed è correlata al peso del testicolo.

La maggior parte degli spermatozoi vengono immagazzinati nella coda dell'epididimo ma anche nel testicolo e nelle altre vie efferenti se ne ritrova un certo numero, come di seguito indicato:

- testicolo:	130-180 milioni/g
- testa e corpo epididimo:	150 milioni
- coda epididimo:	1200-1500 milioni
- canale deferente:	50 milioni

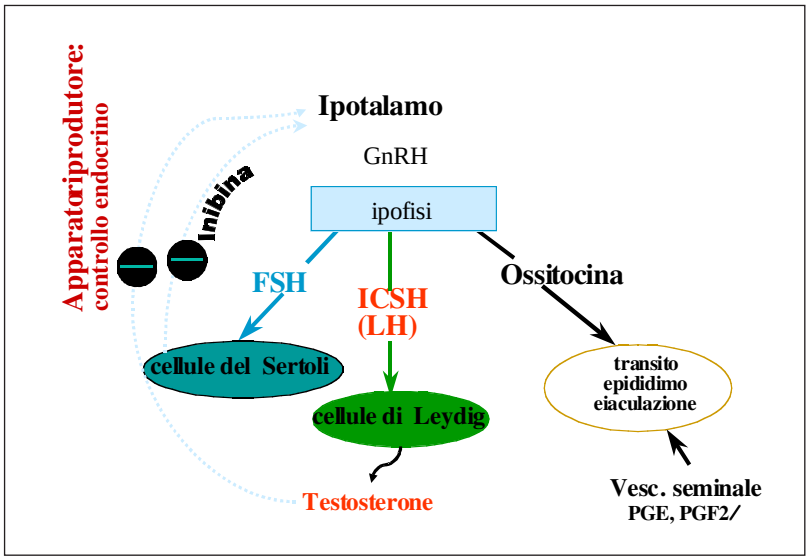
La spermatogenesi e la steroidogenesi dipendono da un complesso meccanismo di controllo a feedback che agisce sul sistema ipotalamo-ipofisi. Le due gonadotropine ipofisarie sono entrambe essenziali sia per la spermatogenesi che per la steroidogenesi. La produzione e secrezione del testosterone è regolata dalla gonadotropina ICSH (LH) ma è necessario anche l'intervento dell'FSH che induce la maturazione delle cellule di Leydig. Il testosterone, a sua volta, regola la produzione di gonadotropine agendo direttamente sulla ipofisi e intervenendo anche sull'ipotalamo ove rallenta la formazione e liberazione del GnRH.

La spermatogenesi dipende sia dai livelli di FSH che dalla corretta funzionalità delle cellule di Leydig, perché gli steroidi androgeni sono essenziali nella fase iniziale del processo e non vengono prodotti dalle cellule di Sertoli, anche se le stesse sono in grado di trasformare il testosterone proveniente dal tessuto interstiziale in estradiolo e in diidrotestosterone.

Il testosterone, quindi, esplica la sua influenza su una vasta gamma di funzioni biologiche: nello stesso testicolo favorisce l'inizio e il mantenimento della spermatogenesi, nella ipofisi coordina i processi di formazione e liberazione delle gonadotropine, nell'ipotalamo la sintesi e il rilascio del GnRH, nelle ghiandole accessorie, infine, stimola la secrezione del plasma seminale.

Il testosterone esplica la sua funzione entrando nelle cellule bersaglio per diffusione passiva e in questa sede può essere convertito in diidrotestosterone ad opera dell'enzima 5α-riduttasi. A questo punto il testosterone o il suo derivato si legano ad un recettore proteico specifico per gli androgeni presente nel citoplasma. Il complesso viene trasformato in una forma attiva che si lega al DNA e passa nel nucleo ove si attacca a speciali siti cromosomali, con trascrizione di un nuovo RNA e comparsa, nel citoplasma, di una nuova proteina.

La secrezione di FSH può essere inibita dall'ormone peptidico inibina, prodotto dai tubu-



li seminiferi.

Altri due ormoni coinvolti nella attività riproduttiva del maschio sono la prolattina e la ossitocina. La prima agisce a livello delle cellule di Leydig (che contengono gli specifici recettori), migliorando la loro risposta all'ICSH. La ossitocina, invece, insieme alle prostaglandine, stimola le contrazioni dei tubuli seminiferi e delle vie efferenti facilitando il transito degli spermatozoi. Sembra che stimoli anche la secrezione delle ghiandole accessorie e che favorisca l'eiaculazione.

L'evoluzione della vita sessuale del maschio si attua in diverse tappe. Il periodo che va dalla nascita a 40 d di età costituisce la fase infantile, caratterizzata da bassi livelli plasmatici di FSH e testosterone e da una crescita lenta dei testicoli e delle vescicole seminali.

Tra 40 e 60 d si verifica un consistente innalzamento dei livelli di testosterone e FSH, la crescita dei testicoli aumenta, le cellule di Leydig cominciano a funzionare stimolando le prime divisioni cellulari a livello dei tubuli seminiferi. Verso i 60 giorni, quando il livello di androgeni raggiunge punte elevate, si intensifica la crescita delle vescicole seminali e si attuano le prime differenziazioni degli spermatogoni.

I primi spermatozoi compaiono verso 110 d di età, ma gli stessi presentano molte malformazioni; cominciano anche a verificarsi le prime manifestazioni di aggressività.

A questo punto finisce la fase prepubere e inizia la pubertà, che viene definita come il momento in cui i testicoli sono in grado di produrre in modo continuativo spermatozoi atti a fecondare l'ovulo: ciò si verifica versi i 4-5 mesi.

Un maschio si considera sessualmente maturo quando la produzione giornaliera di sperma raggiunge un valore costante. Nella Bianca di Nuova Zelanda la completa maturità viene raggiunta verso il 7° mese; sembra invece che il volume, e quindi la secrezione di plasma seminale, aumenti fino a 12 mesi. Il comportamento sessuale del maschio, oltre a dipendere dal livello di testosterone, è condizionato dalla recettività della femmina.

FATTORI DI PRODUTTIVITÀ LEGATI AL MASCHIO

MICHÈLE THEAU-CLÉMENT

INRA. Station d'Amélioration Génétique des Animaux - Castanet Tolosan Cedex, France

La diffusione dell'inseminazione artificiale in coniglicoltura ha portato ad un aumento delle ricerche relative ai principali fattori di produttività spermatica nel maschio. L'obiettivo di questa relazione è quello di fare il punto sulle conoscenze dei fattori legati all'animale ed alle condizioni ambientali e del loro effetto sulla libido e sulla produzione quali-quantitativa di seme. Per ogni argomento sono state riportate soltanto alcune delle pubblicazioni più significative e per tale motivo l'informazione non può ritenersi del tutto esaustiva.

Nella realtà operativa di un allevamento o di un centro di produzione seme la selezione genetica deve mirare all'ottenimento di maschi capaci di produrre seme di elevata qualità destinato all'inseminazione artificiale. Inoltre tali maschi dovranno adattarsi al meglio al prelievo tramite vagina artificiale ed avere una buona libido.

VALUTAZIONE DELL'ARDORE SESSUALE E DELLA PRODUZIONE SPERMATICA

L'ardore sessuale è generalmente stimato in base al tempo che intercorre tra introduzione della femmina ed eiaculazione. La produzione spermatica in termini quantitativi si valuta quantificando il numero di spermatozoi prodotti (NSP). Tale parametro si ottiene dal prodotto tra volume e concentrazione dell'eiaculato. La qualità di un eiaculato può essere definita misurando il pH (al momento della raccolta), la motilità (analisi microscopica di una goccia di seme) e la percentuale di spermatozoi vivi. Gli ultimi due parametri derivano da un'osservazione visiva e rappresentano un tipo di misura soggettiva. Per rimediare a questo inconveniente sono stati messi a punto dei sistemi di analisi di immagine (*Computer Assisted Semen Analyser*) che permettono di valutare molto rapidamente ed in maniera oggettiva la qualità del materiale seminale (THEAU-CLÉMENT, 1996a, 1996b, LATTAIOLI e CASTELLINI, 1998). Tali sistemi consentono agli operatori di ottenere nuovi parametri quali la percentuale di cellule progressive (velocità > 40m/sec e rettilineità > 90%), la velocità media delle cellule (m/sec), l'ampiezza degli scostamenti laterali e la struttura della testa; parametro quest'ultimo utile per stabilire l'attitudine del gamete a penetrare nella zona pellucida dell'oocita. L'analisi d'immagine apre quindi una serie di interessanti prospettive in vista di una valutazione più dettagliata e precisa delle caratteristiche qualitative del seme.

FATTORI CHE INFLUENZANO LA PRODUZIONE DI SEME LEGATI ALL'ANIMALE

Età

Generalmente l'ardore sessuale, il volume, la motilità e la concentrazione sono superiori nell'animale di maggiore età (ALVARIÑO, 2000).

Stato sanitario

Gli animali devono avere un eccellente stato sanitario per esprimere una libido ottimale ed una buona produzione spermatica. Per raggiungere tale obiettivo è necessario assicurare buone misure preventive (vaccinazione) e un controllo regolare dello stato sanitario.

Fattori genetici

E' noto ormai da molto tempo che il tipo genetico degli animali può influenzare le caratteristiche del seme e più in generale la produzione spermatica (VENGE et FRÖLICH, 1951 ; AMANN, 1966 ; ABO EL-EZZ *et al*., 1985 ; DUBIEL *et al*. 1985). Tuttavia esistono al momento pochissimi lavori che hanno studiato per lunghi periodi le caratteristiche quali-quantitative della produzione spermatica di maschi appartenenti a diversi tipi genetici. BENCHEIKH (1993) ha confrontato durante 4 mesi le caratteristiche del seme di due tipi genetici sottoposti a prelievo settimanale (2 eiaculati a 15 minuti di distanza). Nei maschi della linea INRA A1077 (ceppo di origine Neo Zelanda) il numero di spermatozoi per eiaculato è stato circa il doppio del seme e anche le caratteristiche qualitative sono state migliori rispetto ai maschi appartenenti alla linea INRA A2066 (ceppo di origine Californiana - Tabella I).

	A1077	A2066	P
Volume (ml)	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	**
Concentrazione (x 106 spz/ml)	574 ± 260	394 ± 188	**
N° spz/eiaculato (x 106 spz/ml)	321 ± 152	174 ± 198	**
Motilità	7.4 ± 0.9	6.7 ± 1.3	**
% spz mobili	83 ± 11	73 ± 18	**
pH	6.9 ± 0.2	7.0 ± 0.2	**

Tabella 1. Effetto del genotipo sulla produzione seminale

La ripetibilità delle caratteristiche seminali e della produzione spermatica che misura la correlazione esistente tra prestazioni successive di un maschio è generalmente debole (Tabella II). Ciò indica una grande variabilità intra-maschio e minimizza quella tra maschi.

L'utilizzazione di maschi incrociati potrebbe rappresentare una possibile via di miglioramento della produzione spermatica. Infatti, BRUN *et al*. (2002) hanno mostrato un effetto di eterosi significativo sulla concentrazione (37.5% della media parentale), sulla motilità (6.8 %) e sulla percentuale di spermatozoi mobili (4.1 %).

	Panella e Castellini (1990)	*Bencheikh (1993)* **A1077**	**A2066**	*Brun et al. (2002)*
Volume	0.25	0.36	0.38	0.63
Concentrazione (spz/ml)	0.11	0.61	0.38	-
N° spz/éjaculat	0.16	0.47	0.05	0.41
Motilità	0.18	0.25	0.21	0.47
% spz mobili	0.06	0.35	0.10	-
pH	0.18	0.55	0.26	0.57

Tabella 2. Ripetibilità delle caratteristiche biologiche del seme di coniglio

Fattori ambientali

Con l'inseminazione è possibile dissociare nel tempo e nello spazio la raccolta del seme e la sua utilizzazione. I maschi possono dunque essere allevati in ambienti specifici e che possono fornire condizioni ottimali per le prestazioni produttive, in termini di qualità e di omogeneità.

Stagione

L'effetto della stagione è molto forte nel coniglio selvatico, mentre risulta meno evidente nel coniglio domestico. Tuttavia diversi ricercatori hanno messo in evidenza che la stagione può influire sulle performance riproduttive e sulle caratteristiche biologiche del seme (PANELLA e CASTELLINI, 1990, BATTAGLINI *et al*., 1992). BONNANO e COSTANZO (1987) effettuando prelievi di seme su 6 maschi durante un anno (Figura 1), hanno osservato che il volume degli eiaculati è minore durante il periodo caldo e che anche la motilità diminuisce nel mese di agosto. Considerato che la stagione è la risultante dell'effetto combinato di temperatura, fotoperiodo, igrometria, etc., alcuni fattori potranno essere facilmente controllati conoscendo il loro valore ottimale.

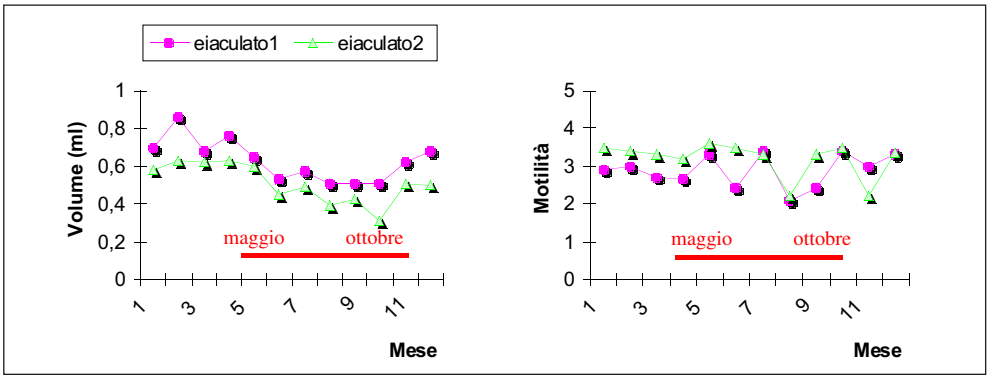


Figura1. Variabilità delle caratteristiche seminali in relazione alla stagione (Bonanno e Costanzo, 1987)

Temperatura

L'esposizione dei maschi a temperature elevate (≥ 30°C) determina una riduzione della libido (RATHORE, 1970, MARTIAL 1981) ed un peggioramento delle caratteristiche seminali (concentrazione, motilità, percentuale di spermatozoi vivi e anomali, BAGLIACCA, 1987). Tale parametro assume grande importanza vista la difficoltà, alle nostre latitudini, di mantenere entro limiti accettabili le temperature all'interno dei ricoveri durante il periodo estivo.

Fotoperiodo

L'effetto dell'illuminazione sulla produzione di seme è stato finora poco studiato. Maschi sottoposti ad illuminazione artificiale di 8 ore per 6 mesi hanno mostrato un peso dei testicoli ed un numero di spermatozoi a livello di epididimo più elevati rispetto ad animali sottoposti ad un fotoperiodo di 16 ore. (WALTER *et al.* 1968). Tali risultati sembrerebbero in contrasto con quanto si osserva nel coniglio selvatico; THEAU-CLÉMENT *et al.* (1995) hanno confrontato la produzione di seme di maschi sottoposti per 6 mesi a 8 o 16 ore di illuminazione giornaliera (con prelievi settimanali di 2 eiaculati a 15 minuti di distanza). Con 16 ore di illuminazione giornaliera è aumentato il numero di spermatozoi vivi/eiaculato (+ 31 %) piuttosto che la loro motilità. SCHÜDDEMAGE (2000) ha riprodotto questa sperimentazione senza giungere alle stesse conclusioni. Tuttavia le condizioni sperimentali di questo studio sono lontane da quelle classiche di utilizzazione dei maschi in inseminazione artificiale (animali razionati, un solo prelievo ogni 15 giorni, utilizzazione di un manichino anziché di una femmina per il prelievo). Immettere dei maschi in un ambiente specifico solo per studiare il fotoperiodo, non può giustificare pienamente l'andamento delle prestazioni riproduttive.

Alimentazione

Pochi autori hanno studiato le relazioni tra alimentazione dei maschi e produzione di seme. NIZZA *et al*. (2000) hanno analizzato le caratteristiche biologiche di eiaculati di maschi sottoposti a 3 differenti diete contenenti 13, 15 o 17% di proteina grezza. Gli animali erano sottoposti a prelievo bisettimanale. Il volume, la motilità e la concentrazione, così come le prestazioni riproduttive dei maschi, sono significativamente diminuite con la razione contenente il 13% di proteine. Gli autori raccomandano dunque un minimo di 15% di proteina grezza nell'alimentazione del coniglio maschio. Inoltre LUZI *et al.* (1996) hanno dimostrato che l'alimentazione *ad libitum* (rispetto ad un razionamento sufficiente a coprire i fabbisogni energetici) migliora l'ardore sessuale e la produzione seminale per eiaculato (+ 29%). La qualità del seme non subisce modifiche significative.

Frequenza di prelievo

Già dagli anni 60 si sono approfondite le conoscenze sulle relazioni esistenti tra frequenza di prelievo e caratteristiche biologiche del seme. Questi vecchi lavori però spesso prendevano in considerazione brevi periodi, con una durata inferiore al ciclo di spermatogenesi e si basavano sull'utilizzo di animali di tipi genetici diversi. In ogni caso suggerivano che un'intensificazione del ritmo di raccolta provocava una significativa riduzione del volume degli eiaculati, della loro concentrazione e della motilità degli spermatozoi. BENCHEIKH (1993,1995) ha studiato per un anno la produzione di seme di 26 maschi sottoposti a 2 pre-

lievi intervallati di 15 minuti, una volta alla settimana, (ritmo estensivo) o 3 giorni alla settimana (ritmo intensivo). I risultati hanno mostrato che il primo sistema rappresenta la migliore soluzione in termini di numero di spermatozoi vivi per eiaculato, (+ 156%), qualità (+ 66% degli eiaculati presentavano un movimento del flagello intenso), produzione per unità di tempo e gestione razionale del cantiere di raccolta. Rispetto al primo eiaculato, il secondo si caratterizzava generalmente per un volume inferiore ma per motilità e concentrazione superiori.

Stimolazione dei maschi

Alcune stimolazioni potrebbero essere praticate per migliorare la produzione di seme. Una falsa monta operata 3 minuti prima dell'introduzione della coniglia con la vagina artificiale permette di moltiplicare per 2,8 il numero di spermatozoi per eiaculato e di aumentare il loro numero nel secondo eiaculato, anche se in proporzioni meno importanti (MACMILLAN e HAFS, 1967). Più recentemente LOPEZ *et al*. (1996) hanno mostrato che la separazione e il raggruppamento di maschi 3 ore prima del prelievo provoca un aumento del volume e della motilità rispetto al prelievo successivo (aumento del 24% di dosi inseminanti).

Trattamenti ormonali

E' possibile aumentare la produzione seminale di maschi scarsamente produttivi, specialmente durante la stagione calda, somministrando GnRH, o hCG (HSU *et al*. 1987, REBOLLAR *et al*., 1998), prostaglandine (EL-GAAFARY *et al*., 1991) o ossitocina (ADB EL-KARIM *et al*., 1998). E' comunque consigliabile non abusare di tali trattamenti.

Altre sostanze

BODNÁR (1998) ha evidenziato l'effetto benefico di un'addizione di caffeina direttamente nel seme sulle performance riproduttive delle coniglie inseminate. Un'alta concentrazione di caffeina (100 mM/l) può esplicare un effetto positivo sulla prolificità delle fattrici (LOPEZ e ALVARIÑO, 2000). Questi autori hanno dimostrato che l'aggiunta di caffeina (10mM/l) permette di migliorare la motilità di un miscuglio eterospermatico di seme conservato per 24 ore a 18°C, ma non migliora la fertilità e la prolificità delle femmine. Inoltre l'aggiunta di 200 mg di vitamina E per kg di mangime e di 0.5 mg di vitamina C per litro di acqua di bevanda per 6 settimane, migliora significativamente la velocità, la percentuale di cellule mobili e di spermatozoi capacitati, in particolar modo quando il seme viene congelato (CASTELLINI *et al*., 2001). L'aggiunta di prostaglandine E_2 direttamente nel seme provoca un aumento della fertilità, probabilmente legato all'intensificazione della motilità uterina che favorisce un trasporto più rapido degli spermatozoi fino al sito di fecondazione (ALVARIÑO e REBOLLAR, 1991).

Metodi di raccolta

Il metodo di raccolta può condizionare l'esito del prelievo e la qualità del seme. Infatti una temperatura troppo bassa della vagina artificiale si potrebbe tradurre in un rifiuto da parte del maschio, mentre una temperatura troppo elevata potrebbe provocare uno shock ter-

mico molto dannoso per la sopravvivenza degli spermatozoi.

MERCIER e RIDEAUD (1990) e CENCI (1993) hanno dimostrato che il seme può rappresentare un vettore di malattie e che anche in animali in buono stato sanitario si possono verificare contaminazioni di tipo ambientale. SINKOVICS (1993) e DAL BOSCO *et al.* (1996), hanno proposto dei prototipi di vagina artificiale capaci di ridurre la contaminazione del seme al momento del prelievo. Risulta peraltro indispensabile che le mani dell'operatore, il locale di analisi, il materiale di raccolta (vagine artificiali, vetreria, materiale di inseminazione) siano rigorosamente lavati e disinfettati prima di ogni utilizzazione. Attualmente l'utilizzo di materiale usa e getta permette di raggiungere una sicurezza accettabile sotto questo punto di vista. Inoltre la maggior parte dei diluitori commerciali contengono degli antibiotici che permettono un contenimento delle contaminazioni a livello di seme.

In conclusione, i fattori ambientali, l'alimentazione, il ritmo di prelievo e le stimolazioni possono influenzare il comportamento sessuale dei maschi, la quantità e soprattutto la qualità del loro seme; la conoscenza delle condizioni ottimali di allevamento dei maschi rappresenta un mezzo per l'ottenimento di un numero maggiore di dosi di migliore qualità. E' in particolare auspicabile un controllo regolare del loro stato sanitario. A livello di condizioni ambientali gli animali debbono essere sottoposti ad regime di luce costante di 16 ore al giorno e alimentati *ad libitum* con un mangime contenente almeno il 15% di proteina grezza.

Infine, l'analisi di immagine costituisce un mezzo in grado di risalire alle condizioni ottimali di allevamento nell'ambito delle quali i maschi producono seme di ottima qualità e di stabilire i criteri di previsione di fertilità e prolificità.

BIBLIOGRAFIA

1) ABD EL-KARIM, M.A., GABR, H. A., SELEM, T. S.T. Effects of oxytocin or adrenaline on reproductive performance of New Zealand White male rabbits. *In: 1st Int. Conf. Anim. Prod. Health in Semi-arid Areas,* 417-421. 1998.

2) ABO EL-EZZ Z.R., KOSBA M.A., HAMDY S.M., SOLIMAN F.N. Effect of crossing on semen characteristics in rabbits. *Beitrage Trop. Landwirtsch. Veterinärmed*. 23: 429-434. 1985.

3) ALVARIÑO, J.M.R., REBOLLAR, P.G. Adición de prostaglandinas al semen diluído de conejo: Efecto sobre la fertilidad y prolificidad. *IV Jornadas Prod. Anim., I.T.E.A.,* 11: 25-27. 1991.

4) ALVARIÑO, J.M.R., Reproductive performance of male rabbits. *7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain),* Vol A: 13-35. 2000.

5) AMANN R.P. Effect of ejaculation frequency and breed on semen characteristics and sperm output of rabbits, *J. Reprod. Fertil.,* 11: 291-293. 1966.

6) BAGLIACCA, M., CAMILLO, F ET PACI, G. Temperatura e performance di conigli maschi reproduttori. *Rivista di coniglicoltura*, 24(10): 61-65. 1987.

7) BATTAGLINI, M., CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P. Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. Appl. Rabbit Res*., 15: 439-446. 1992.

8) BENCHEIKH N. Production de sperme et fertilité du lapin mâle Oryctolagus cuniculus. Effet de la fréquence de collecte et du type génétique. *Thèse d'Etat. Ecole Nationale Agronomique de Toulouse.* 1993.

9) BENCHEIKH N. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoïdes récoltés chez le lapin. *Ann. Zoot*., 44: 263-279. 1995.

10) BODNÁR, K. The effect of caffeine administration to diluted semen on the progeny in rabbit. *World Rabbit Science,* 6 (2): 255-257. 1998.

11) RUN J.M., THEAU-CLÉMENT M., BOLET, G. Evidence for heterosis and maternal effects on rabbit semen characteristics. *Anim. Res*., 51: 433-442. 2002.

12) BONNANO A., COSTANZO D. Influenza di fattori fisiologici e climatici sul determinismo dei principali parametri riproduttivi di 1987. coniglie sottoposte ad inseminazione artificiale. *Rivista di coniglicoltura,* 24 (3) : 33-39.

13) CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P., DAL BOSCO, A., LIGUORI, L. Effet de l'addition des vitamines C et E sur les paramètres de la semence de lapin fraîche et après congélation. *9èmes Journ. Rech. Cunicole Paris*, 151-154. 2001.

14) CENCI, T. Caratteristiche igienico-sanitarie del seme di coniglio. Corso CEE-TUCEP "Valutazione computerizzata del seme di coniglio in vista della crioconservazione" Bastia, 18-20 Marzo 1993. 1993.

15) DAL BOSCO, A., SCUOTA, S., CASTELLINI, C., CENCI, T. Study of an artificial vagina to reduce the microbial contamination of rabbit semen. *World rabbit Science,* 4(4): 201-204. 1996.

16) DUBIEL A., KROLINSKY J., FARPIAKOWA C. Semen quality in different breeds of rabbits in different seasons*, Med. Wetrynaryja,* 41: 680-684. 1985.

17) EL-GAAFARY, M.N., ABD EL-HAMID, M., ABD EL-RAHIM, M.I. 1991. Acrosomal damage and enzyme release of rabbit semen supplemented with prostaglandin F_2. *Anim. Rep. Sci.,* 24: 153-157.

18) HSU, H. HSU, J., ZHOU, S., WENG, Q., WANG, Y. 1987. The effect of gonadotrophin releasing hormone on reproductive performance of male rabbits. *J.Appl. Rabbit Res.,* 10: 10-11.

19) LATTAIOLI, P. et CASTELLINI, C. Efficacité d'un système d'analyses d'images pour évaluer la semence de lapin. *7èmes Journ. Rech. Cunicole Fr., Lyon*, 1998: 233-236. 1998.

20) LOPEZ, J., ALVARIÑO, J.M.R., DEL ARCO, J.A., BUENO, A., SANZ, C. Effect of male rabbit management on semen production. *6th World Rabbit Congress, Toulouse (France),* 2: 83-85. 1996.

21) LOPEZ, J., ALVARIÑO, J.M.R. 2000. Effects of added caffeine on results following artificial insemination with fresh and refrigerated rabbit semen. *Anim.Rep. Sci.,* 58(1/2): 147-154.

22) LUZI, F., MAERTENS, L., MIJTEN, P., PIZZI, F. Effect of feeding level and dietary protein content on libido and semen characteristics of bucks. *6th World Rabbit Congress, Toulouse,* 2: 87-92. 1996.

23) MARTIAL, J.P. L'élevage du lapin en ambiance chaude et humide : étude de quelques réponses zootechniques et physiologiques. Mémoire de fin d'études. *Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie de Rennes*. 1981.

24) MC MILLAN, K.L. AND HAFS, H.D. Semen output of rabbit ejaculated after varying sexual preparation. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine,* 124(4): 1278-1281. 1967.

25) MERCIER, P., RIDEAUD, P. Bacteriological study of rabbit sperm and the effects of antibiotic supplements in the conservation medium. *J. Appl. Rabbit Res.,* 15: 520-529. 1992.

26) NIZZA, A., DI MEO, C., TARANTO, S. Influence of dietary protein content on libido and semen characteristics bucks. *7th World Rabbit Congress, Valencia (Spain),* Vol A: 217-223. 2000.

27) PANELLA F., CASTELLINI C. Fattori ambientali e genetici che influiscono sulle caratteristiche del seme di coniglio. *Riv. di Coniglicoltura,* 27 (8), 39-41. 1990.

28) RATHORE, A.K. High temperature exposure of male rabbits : fertility of does mated to buck subjected to 1 to 2 days of heat treatment. *Br. Vet. J.,* 126: 168. 1970.

29) REBOLLAR, P.G., UBILLA, E., ALVARIÑO, J.M.R., LORENZO, P.L., SILVÁN, G., ILLERA, J.C. Effects of HCG or gonadoreline on seminal parameters and plasma testosterone levels in young male rabbits. *J. Physiol. Biochem,* 54 (3) : 161-168. 1998.

30) SCHÜDDEMAGE, M. Untersuchungen zum Einflub von Naturlicht im Vergleich zu zwei verschiedenen Kunstlichtregimen auf die Reproduktionsparameter weiblicher und männlicher Kaninchen (*oryctolagus cuniculus*). Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giebben. 142 pp.

31) SINKOVICS, G., CENCI, T., SCUOTA, S., DAL BOSCO, A. Un'idea per la f.a. Un nuova vagina artificiale per la raccolta igienica del seme di coniglio. *Riv. di Coniglicoltura,* 30(9): 35-36. 1993.

32) THEAU-CLÉMENT, M., MICHEL, N., BOLET, G., ESPARBIÉ, J. Effects of artificial photoperiods on sexual behaviour and sperm output in the rabbit. *Animal Science,* 60 : 143-149. 1995.

33) THEAU-CLÉMENT, M., LATTAIOLI, P., ROUSTAN, A., CASTELLINI, C. Reliability and accuracy of a computerised semen image analyses to evaluate various biological parameters in rabbit semen. *6th World Rabbit Congress, Toulouse (France)*, 1996, Vol 2: 139-142. 1996a.

34) THEAU-CLÉMENT, M., LATTAIOLI, P., ROUSTAN, A., CASTELLINI, C. A comparison between computerised semen image analyses and visual methods to evaluate various biological parameters in rabbit semen. *6th World Rabbit Congress, Toulouse (France)*, 1996, Vol 2: 133-137. 1996b.

35) VENGE O., FRÖLICH A. Semen production in different breeds of rabbits. *Acta Agric. Scand.,* 1: 291-300. 1951.

36) WALTER M.R., MARTINET L., MORET B., THIBAULT C. Régulation photopériodique de l'activité sexuelle chez le lapin mâle et femelle. *Archives Anatomie Histologie et Embryologie,* 51: 773-780. 1968.

ANALISI ULTRAMICROSCOPICA DEL SEME DI CONIGLIO

GIULIA COLLODEL

Dipartimento di Pediatria, Ostetricia e Medicina della Riproduzione, sez. Biologia
Università degli Studi di Siena

Nel XX° secolo il miglioramento dei microscopi e delle tecniche di microscopia è stato di importanza decisiva per le scoperte relative all'ultrastruttura della cellula spermatozoo. La forma e le dimensioni dello spermatozoo con i suoi organuli sono strettamente dipendenti sia dalla biologia riproduttiva sia dalla posizione filogenetica. Il solo organulo che è sperma-specifico (ed estesamente distribuito nel regno animale) è l'acrosoma; gli altri organuli dello spermatozoo sono come quelli tipici delle cellule somatiche.

Lo spermatozoo deve avere una forma ben adatta alle sue funzioni, dato che ogni sua particolarità morfologica è destinata al raggiungimento di uno o di entrambi i due suoi principali compiti: muoversi per avvicinarsi all'uovo e fondersi con esso.

Lo spermatozoo di coniglio è lungo circa 50-60 μm, ha una testa larga ed appiattita ed un rimanente segmento lungo, cilindrico e sottile detto coda.

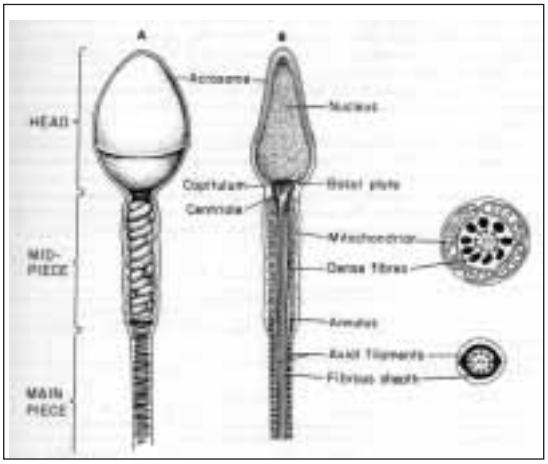


Figura 1. Schema della struttura di uno spermatozoo di mammifero.

La testa è delimitata dalla plasma membrana ed è costituita dal nucleo e dall'acrosoma ; la plasma membrana è trilaminare e nella sua superficie esterna presenta uno strato di glicoproteine.

Il nucleo dello spermatozoo maturo è molto denso poiché costituito da cromatina strettamente impacchettata. La sua forma è ovale, leggermente schiacciata con la porzione anteriore conica e la posteriore convessa a determinare la fossetta di impianto dove sorge il flagello. Nella parte anteriore del nucleo, si trova l'acrosoma, una struttura a cappuccio, delimitata da una propria membrana trilaminare. Il contenuto acrosomale comprende enzimi ad elevato potere proteolitico e glicolitico che permettono la penetrazione dello spermatozoo attraverso gli involucri ovulari durante la fecondazione.

Il più importante componente enzimatico è l'acrosina, ma sono presenti anche ialuronidasi, collagenasi, fosfatasi acida, fosfolipasi A, arilsulfatasi, etc.

La coda dello spermatozoo è una struttura molto complicata che produce il movimento

Figura 2. Sezione longitudinale al Microscopio elettronico a trasmissione della testa di uno spermatozoo di coniglio.

flagellare essenziale per spingerlo avanti. È rivestita dalla plasma membrana trilaminare e da un glicocalice esterno; vi sono però indicazioni che esistono precise ed importanti differenze molecolari nei vari segmenti.

Il primo segmento si chiama collo; in questa regione, anteriormente all'assonema sono inseriti il capitulum, nove colonne segmentate ed il centriolo.

Il segmento successivo al collo, nel coniglio lungo circa 8.8 μm, è chiamato pezzo mediano e contiene i mitocondri disposti in un manicotto che circonda l'assonema.

Il lungo segmento di coda, 40 μm circa, che fa seguito al pezzo mediano prende il nome di pezzo principale; in esso manca la tunica di mitocondri, ma l'assonema è circondato da un complicato scheletro posto immediatamente sotto la plasma membrana e costituto da tre elementi: l'annulus, la guaina fibrosa e le due colonne della guaina.

L'assonema infine, detto anche "filamento assile", è una struttura flagellare, costituita da microtubuli, fibre ed elementi di connessione. Esso è costituito da nove doppietti di microtubuli periferici (A; B) e da due singoli microtubuli centrali; da ogni tubulo A si protendono verso il tubulo B due bracci e centripetamente dei raggi radiali che terminano in vicinanza dei tubuli centrali. I doppietti sono inoltre uniti tra loro da legami periferici. Esternamente ai nove doppietti, e per l'intera lunghezza del pezzo mediano e del pezzo principale della coda si incontrano nove fibre accessorie (1).

Il microscopio elettronico a trasmissione fornisce determinanti informazioni sulla condizione acrosomale, sul grado di condensazione della cromatina, sulla corretta posizione del segmento equatoriale.

Riguardo alla coda è possibile valutare perfettamente la corretta organizzazione dell'assonema e di tutte le sue strutture accessorie.

Il microscopio elettronico a scansione, offrendo un'immagine tridimensionale, fornisce informazioni chiare ed evidenti sullo stato della plasma membrana, sulla morfologia della testa e della coda .

Lo studio ultramicroscopico degli spermatozoi di mammifero ha consentito prima una conoscenza corretta dei singoli componenti strutturali e bene ha spiegato il loro ruolo funzionale, poi ha permesso l'individuazione di differenti condizioni patologiche. Esistono situazioni anatomiche, agenti infettivi che danneggiano più o meno reversibilmente il testicolo e la spermatogenesi. Si aggiungono a questi, quei rari casi in cui il difetto è di origine genetica e la stessa malformazione colpisce la totalità della popolazione spermatica.

Informazioni sull'ultrastruttura dello spermatozoo possono essere fornite anche da uno studio immunocitochimico al microscopio ottico.

L'utilizzo di specifici anticorpi coniugati con sostanze

Figura 3. Fotografia al microscopio elettronico a scansione di uno spermatozoo di coniglio.

Figura 4. Fotografia al microscopio ottico a fluorescenza dopo trattamento con sostanze fluorescenti degli spermatozoi di coniglio.

Figura 5. Sezione longitudinale al Microscopio elettronico a trasmissione della testa di uno spermatozoo di coniglio con acrosoma gravemente malformato.

fluorescenti o enzimi e diretti contro importanti proteine presenti nella cellula rende infatti possibile la loro esatta localizzazione in situ (2).

Queste indagini sono utilizzate per esempio nella verifica dell' integrità del contenuto acrosomale in diverse condizioni sperimentali o nello studio della composizione della plasma membrana nei differenti distretti cellulari e in cambiamenti funzionali fondamentali per la maturazione, quali il transito epididimale o la capacitazione (3).

Inoltre, con lo studio ultramicroscopico, è stato evidenziato il possibile impatto negativo sulla fertilità dei conigli esercitato da sostanze presenti nell'ambiente o nell'alimentazione e dall'effetto congelamento-scongelamento. Questi sono solo due dei molteplici esempi in cui l'analisi strutturale ha giocato un ruolo determinante (4). In entrambi gli studi è stato possibile evidenziare quali organuli fossero i più significativamente colpiti nelle differenti condizioni sperimentali (4, 5).

Il microscopio elettronico a trasmissione si rende inoltre indispensabile nello studio della condizione testicolare permettendo una conoscenza approfondita della spermatogenesi sia essa normale o patologica (5).

Tutte queste informazioni assumono grande rilevanza per il loro successivo aspetto applicativo.

La valutazione ultramicroscopica in parallelo ad altri differenti tipi di studio siano essi biochimici o molecolari può quindi confermare o indicare importanti vie da seguire sia nella ricerca di base sia in quella applicativa.

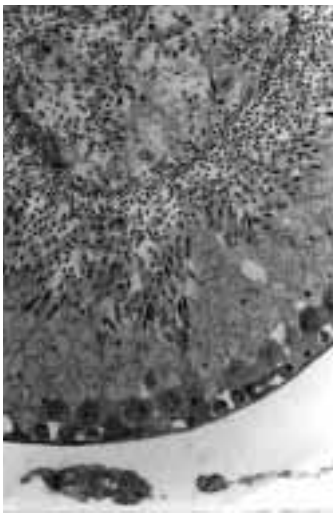


Figura 6. Sezione trasversale al microscopio ottico di tubulo seminifero di testicolo di coniglio fertile.

BIBLIOGRAFIA

1) BACCETTI B., BRAGA G., BURRINI A.G., COLLODEL G., COSTANTINO-CECCARINI E., ESTENOZ M., GATTI G., GIORDANO R., MAGNANO A.R., PIOMBONI P., RENIERI T., SOLAZZO D. Molecular probes for testing bovine sperm quality. In "Embryonic development and manipulation in animal production: Trends in research and application" Lauria A, Gandolfi F (Eds.), Portland Press Ltd. London, pp.37-49. 1992.

2) BACCETTI B., BURRINI A.G., CHEN J.S., COLLODEL G., GIACHETTI D., MATTEUCCI F., MENESINI-CHEN M.G., MORETTI E., PIOMBONI P., SENSINI C. valuation of the antifertility activity of the broom *Spartium Junceum* in the mammalian male. *Zygote*, 1: 71-8. 1993.

3) BEDFORD J.M., HOSKINS D.D. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In "Marshall's Physiology of Reproduction". Lamming GE (Ed.), Churchill Livingstone, vol.2, pp.379-568. 1990.

4) CASTELLINI C., GIACHETTI D., BOITI C., COLLODEL G., MORETTI E., PIOMBONI P. Effetto del cumestrolo sull'attività riproduttiva del coniglio maschio. 7° Meeting Nazionale "Studio dell'efficienza riproduttiva degli animali di interesse zootecnico", Bergamo, maggio 1995, pp.33-7. 1995.

5) GOLDMAN R.D., BACCETTI B., COLLODEL G., GAMBERA L., MORETTI E., PIOMBONI P. Localization of lamins in mammalian spermatozoa. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 30, 573-80.1998.

METABOLISMO DELLO SPERMATOZOO DI CONIGLIO

LAVINIA LIGUORI, ILARIA BELLEZZA

Dipartimento di Scienze Biochimiche e Biotecnologie Molecolari
Sez. Biochimica Cellulare. Università degli Studi di Perugia

Con il termine metabolismo intendiamo l'insieme delle reazioni cataboliche e anaboliche che avvengono nell'organismo per garantire alle cellule un'adeguata disponibilità di nutrienti ed energia tali da consentire e mantenere la vita.

Le reazioni cataboliche sono quelle che consentono, tramite la degradazione di macromolecole complesse, di ottenere molecole semplici, precursori per la sintesi di macromolecole necessarie al mantenimento della vitalità cellulare e soprattutto permettono la sintesi di ATP (adenosina trifosfato), la molecola utilizzata dai sistemi viventi come "moneta" di scambio energetico.

L'ATP è richiesto come fonte di energia per garantire la motilità degli spermatozoi.

Queste cellule hanno un metabolismo molto specializzato e la richiesta di energia è finalizzata al mantenimento della motilità che consente al gamete maschile di raggiungere la cellula uovo e fertilizzarla.

Nei mammiferi con fecondazione interna gli spermatozoi possono usufruire dell'apporto di molti nutrienti presenti nel plasma seminale, fluido che varia la sua composizione in modo specie-specifico. Nel plasma seminale di coniglio sono presenti, in concentrazioni tipiche della specie, ioni, proteine, glicidi, lipidi, enzimi. Il pH di 6.8 consente di neutralizzare la carica acida dell'apparato genitale femminile (circa 5.0), che ha effetti molto negativi sulla motilità e sopravvivenza degli spermatozoi. Gli spermatozoi di coniglio possono produrre ATP sia dalla glicolisi che dalla fosforilazione ossidativa ma sono presenti in questa cellula anche sistemi "shuttle" dei fosfati come la Creatina Chinasi (CK) e l'Adenilato Chinasi (AK), che consentono di risintetizzare ATP in compartimenti cellulari diversi dai mitocondri.

Non tutti gli spermatozoi di mammifero hanno questi sistemi fosfageni: la presenza di CK è stata riscontrata nel bovino, cavallo e ratto, mentre in queste specie l'AK sembra essere assente. Negli spermatozoi di coniglio AK presenta un'alta attività e sembra svolgere un ruolo fondamentale nel mantenimento di elevate concentrazioni di ATP nella cellula.

Un equilibrio dinamico tra sintesi e degradazione di ATP suggerisce che gli spermatozoi di coniglio utilizzano i nutrienti forniti dal plasma seminale per mantenere la loro motilità anche per diverse ore.

Spermatozoi mantenuti in plasma seminale infatti mostrano una considerevole risintesi di

Table 1. *Residual ATP content under physiological conditions*

Time (minutes)	% ATP*					
	Seminal plasma	Buffer A	Buffer A + 67 mM glucose	Buffer A + 67 mM Na-butyrate	Buffer A + 67 mM glucose–67 mM Na-butyrate	Mean standard error
0	100	100	100	100	100	
60	19.8 A	38.1 B	43.9 B	28.1 AB	57.5 B	7.45
120	—	43.1 B	24.1 AB	19.1 A	34.4 AB	8.72
180	116.6 C	48.1 B	34.3 B	19.0 A	11.5 A	11.65
240	—	43.3 B	37.8 B	43.1 B	2.3 A	7.95
300	87.4 C	44.5 AB	39.5 A	33.1 A	55.1 B	8.74
360	47.2 B	48.9 B	33.8 AB	18.1 A	44.7 B	9.60

ATP, adenosine triphosphate.
* Values with different letters on the same row are statistically different from one another at $P < 0.001$.

Table 2. *Residual ATP content in the presence of inhibitors*

Time (minutes)	% ATP*						
	Ouabain 10 μM	Deoxyglucose 67 mM	Vanadate 0.5 mM	DNFB 5 mM	Ap_5 A 50 μM	KCN 10 mM	Mean standard error
0	100	100	100	100	100	100	
60	0.2 A	27.1 C	114.5 D	24.4 C	11.1 B	1.8 A	7.45
120	0.04 A	15.2 C	—	5.5 B	4.8 B	0.2 B	8.72
180	0 A	10.1 B	46.8 C	0 A	0 A	0 A	11.65
240	0 A	10.2 B	—	0 A	0 A	0 A	7.95
300	0 A	10.1 B	1.4 A	0 A	0 A	0 A	8.74
360	0 A	10.1 B	0 A	0 A	0 A	0 A	9.60

ATP, adenosine triphosphate; DNFB, 2,4-dinitrofluorobenzene; ApSA, diadenosine pentaphosphate; KCN, potassium cyanide.
* Values with different letters on the same row are statistically different from one another at $P < 0.001$.

ATP che mantiene elevata la concentrazione del nucleotide anche dopo 6 ore.

Anche in presenza di Citrato, Glucosio e Na-butirrato le cellule riescono a mantenere alto il livello di ATP. Questo dimostra che le cellule germinali maschili riescono a trarre energia da questi nutrienti presenti nel mezzo.

L'azione di diversi inibitori del metabolismo dell'ATP mostra chiaramente come l'enzima ATPasi-dineina dipendente, inibito dal Vanadato, sia il maggior responsabile della degradazione del nucleotide. Questo enzima infatti, idrolizzando ATP, consente il movimento delle fibre di tubulina della coda dello spermatozoo e quasi tutto l'ATP prodotto è utilizzato per il mantenimento della motilità. Reagenti come il 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB), inibitore della CK e Ap_5A (diadenosina pentafosfato), inibitore dell'AK, abbassano drasticamente la concentrazione di ATP dopo 120 minuti, indicando un ruolo importante di questi enzimi nel metabolismo energetico degli spermatozoi di coniglio.

Anche con inbitori della pompa Na^+/K^+ ATPasi, responsabile del mantenimento dell'osmolarità cellulare, o inibitori della fosforilazione ossidativa il valore di ATP scende a zero dopo appena 60 minuti.

Nella membrana esterna degli spermatozoi di coniglio sono presenti diversi enzimi coinvolti nel metabolismo dei nucleotidi adenilici e di conseguenza implicati nel mantenimento di valori fisiologici di carica energetica.

Attività enzimatiche di spermatozoi di coniglio		
Creatina Chinasi	1.1 ±0.098	nmol/min per $100x10^6$ cell.
Adenilato Chinasi	7,000± 0.1	nmol/min per $100x10^6$ cell.
5' Nucleotidasi	6.2 ± 0.5	nmol/min per $100x10^6$ cell.
Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi	2.7 ± 0.31	nmol/min per $100x10^6$ cell.

L'alta attività dell'Adenilato Chinasi, fa ipotizzare un ruolo fondamentale di questo enzima nell'equilibrare le riserve di nucleotidi ed è parte integrante del sistema di trasferimeto dei gruppi fosfato operato anche dall'enzima CK.

Anche vescicole, presenti nel plasma seminale di coniglio, sono coinvolte nel metabolismo energetico.

Queste vescicole sono di diverse dimensioni e circondate da una membrana a doppio strato fosfolipidico: le più grandi hanno un diametro di circa 160 nm e le più piccole misurano 70 nm.

Anche in altri mammiferi, compreso l'uomo è stata riscontrata la presenza di vescicole seminali ma, l'origine, sembra essere diversa nel coniglio. Nell'uomo sono secrete dalle cellule epiteliali della prostata, nel coniglio si pensa ad un'origine epididimale.

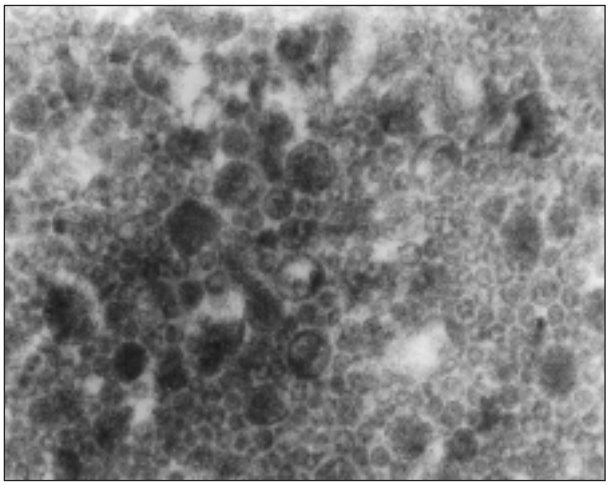


Figura 1: Microscopia elettronica di vescicole seminali di coniglio.

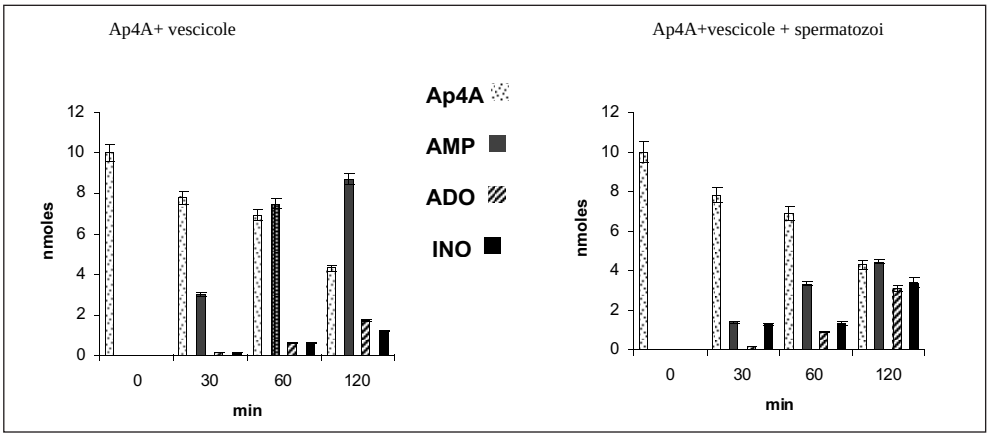
Valutando le attività enzimatiche presenti sulla loro superficie si sono riscontrate:

ApnA idrolasi, ATPasi, ADP asi, 5' Nucleotidasi, Adenosina deaminasi e Fosfatasi Alcalina, tutti enzimi adibiti alla degradazione e trasformazione dei nucleotidi adenilici.

La presenza dell'enzima ApnA idrolasi indica che i prodotti di degradazione dei composti diadenosici, composti ubiquitari responsabili di svariati effetti fisiologici, sono coinvolti nel processo di attivazione cellulare negli spermatozoi di coniglio.

Se infatti un diadenosico (Ap4A) viene incubato in presenza di vescicole o con vescicole e spermatozoi il pattern di degradazione risulterà diverso.

In presenza di sole vescicole il prodotto che si accumula nel tempo è l'AMP. In presenza di spermatozoi si producono, dopo 120 minuti, anche adenosina ed inosina; questo è dovuto alla presenza di enzimi sulla superficie cellulare quali la 5'-nucleotidasi che trasforma l'AMP in ADO sulla quale agisce l'Adenosina Deaminasi che la converte in Inosina. La produzione di Adenosina da parte dello spermatozoo promuove il processo di attivazione cellulare mediante interazioni specifiche di questo nucleoside con recettori presenti sulla membrana cellulare.



ANALISI MICROSCOPICA DEL SEME DI CONIGLIO MEDIANTE COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYSER

PAOLO LATTAIOLI

Dipartimento di Scienze Zootecniche, Borgo XX giugno, 74 - 06121 Perugia

PREMESSA

Fino a qualche anno fa la qualità del seme era valutata mediante parametri soggettivi come la mobilità massale ed individuale, ed oggettivi, come la concentrazione e le anormalità morfologiche. Le valutazioni microscopiche soggettive sia nell'uomo che negli animali, conducono a variazioni dal 30 al 60% nella stima dei parametri di mobilità di uno stesso eiaculato. Per superare questo inconveniente sono stati proposti diversi sistemi come la torbidimetria, la spettroscopia laser-doppler e la fotometria. Tuttavia neppure questi sistemi sono sufficientemente indicativi perchè permettono una stima 'grezza' dell'intera popolazione, valutando la concentrazione totale del seme e la mobilità, senza prendere in esame il singolo spermatozoo.

I più recenti sistemi di analisi della traccia, basati sulla valutazione di spermatozoi individuali, consentono un accurato calcolo di importanti parametri seminali. All'inizio si è partiti microfotografando il movimento degli spermatozoi, ricostruendo ed analizzando poi le tracce manualmente. Il COMPUTER ASSISTED SEMEN ANALYZER (CASA) proposto per la prima volta da Foster 20 anni fa, è stato e è tuttora adottato in alcuni centri andrologici di umana e veterinaria. Le immagini ottenute permettono l'analisi di molti parametri, quali la concentrazione del seme, il movimento e la morfologia della testa degli spermatozoi. Sono state trovate buone correlazioni tra parametri misurati soggettivamente e CASA in umana e in molte specie animali.

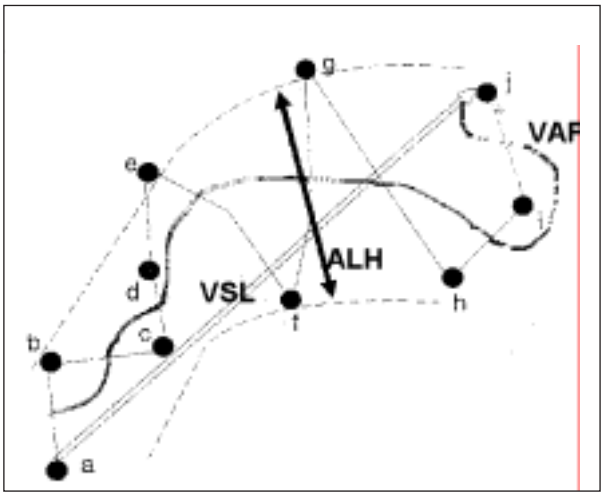
La registrazione di dati quantitativi con il CASA consente di confrontare dati standard permettendo la classificazione degli eiaculati e successiva elaborazione dei dati registrati per la predizione della fertilità o per gli studi di biologia del seme, in funzione di trattamenti diversi.

Gli svantaggi del CASA sono rappresentati dal costo dello strumento, dalla necessità di essere validato, dal controllo qualità e standardizzazione delle misure effettuate.

La principale specie per la quale il CASA viene usato è l'uomo, principalmente nei centri fertilità, per valutare la qualità del seme prima dell'inseminazione artificiale e per correlare la qualità del seme (morfologia e movimento) con la fertilità.

ANALISI DELLA MOTILITÀ

Esistono strumenti diversi per la valutazione CASA, basati su ottiche e programmi per l'identificazione degli spermatozoi e la ricostruzione delle traiettorie. Nel sistema l'utente può selezionare il tasso di acquisizione delle immagini tra 15, 25 o 60 Hz, il numero di immagini da analizzare e la distanza in micron tra i punti di due immagini successive per calcolare la traccia di una cellula nell'analisi della mobilità. L'utente può anche definire una differente soglia di intensità e range di area, che sono essenziali per discriminare tra testa di spermatozoi e altre cellule eventualmente presenti nel campione. Il settaggio deve essere effettuato in un range più ampio possibile di campioni.



Il CASA fornisce le medie per una classificazione obiettiva di una data popolazione di spermatozoi; attraverso le immagini digitali di ogni traccia il CASA può analizzare, tramite algoritmi, il movimento degli spermatozoi. I parametri del CASA sono costituiti da velocità curvilinea (VCL), che è la velocità media misurata punto per punto sulla traccia in mm/s; ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH) in µm; frequenza d'incrocio (BCF), che è la frequenza alla quale la testa della cellula incrocia la traiettoria media della cellula in Hz; velocità media (VAP), la velocità della traiettoria media in µm /s; velocità rettilinea (VSL), che rappresenta la velocità misurata in linea retta tra l'inizio e la fine dello spostamento in µm /s; rettilineità (STR), data dal rapporto percentuale VSL/VAP (stima l'approssimarsi della traccia media alla linea retta); e linearità (LIN) data dal rapporto percentuale VSL/VCL (stima l'approssimarsi della traccia alla linea retta).

L'intera popolazione di spermatozoi viene suddivisa in 4 categorie così classificate: rapidi dove VAP>MVV; medi, dove LVV<VAP<MVV; lenti dove VAP<LVV; e statici costituiti dalla frazione di cellule che non presentano movimenti durante l'analisi. La percentuale di spermatozoi progressivi include cellule che si muovono con VAP>MVV e STR>So (So, soglia di rettilineità per determinare gli spermatozoi progressivi).

La mobilità spermatica è comunemente ritenuta la più importante caratteristica per valutare il potenziale di fertilità di sperma eiaculato. Si è infatti visto che il tasso di fertilizzazione di oociti animali o umani è correlato positivamente con la mobilità spermatica.

Non è ancora chiaro quali caratteristiche del movimento valutate con il CASA abbiano valore clinico per prevedere la fertilità e il tasso di fertilizzazione.

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE

Nella valutazione del seme, la concentrazione è certamente uno dei più importanti parametri, poichè in molte specie la sterilità è associata a basse concentrazioni. L'accurata valutazione della concentrazione seminale con i CASA resta ancora un problema aperto per ogni specie; essendo la sovrastima una comune osservazione. Questa è stata attribuita da differenti autori alla collisione degli spermatozoi con la conseguente multipla valutazione dello stesso spermatozoo.

In alcuni casi ed in particolare a basse concentrazioni (20-50 10^6/ml) i valori del CASA per concentrazione e percentuale di mobilità sono presumibilmente inattendibili e i valori di mobilità sottostimati.

I risultati di concentrazione spermatica con il CASA, oltre il range di concentrazione spermatica raccomandato dal costruttore, devono essere verificati con i metodi manuali usando NaCl per uccidere le cellule.

VALUTAZIONE DELLA MORFOLOGIA

In numerosi centri seme, le valutazioni della morfologia sono eseguite di routine mentre la classificazione della testa degli spermatozoi è fatta manualmente. La valutazione manuale della morfologia spermatica si è talora dimostrata problematica, essendo state riscontrate sensibili variazioni tra tecnici e laboratori che rendono difficoltosa una corretta interpretazione dei risultati.

La valutazione automatizzata della morfologia spermatica è un processo complesso, costituito da tre step. Il primo consiste nella preparazione del campione (lavaggio, fissazione e colorazione); il secondo nell'acquisizione dell'immagine con microscopio in campo chiaro. Il terzo nell'analisi dell'immagine. Colorazione del campione, ingrandimento e ottiche vengono accuratamente scelte per massimizzare la qualità dell'immagine prima dell'immissione nel computer. Il sistema automatico classifica gli oggetti, in base ad un setup, volto a distinguere le immagini di spermatozoi da quelle di particelle o cellule sovrapposte. Chiaramente, la qualità della classificazione è altamente dipendente dalla scelta dei parametri, i quali spesso sono intuitivi o talvolta basati sull'esperienza progressivamente acquisita. Una classificazione pratica divide le cellule spermatiche in normali (forma ovale della testa), amorfe (testa irregolare), testa assottigliata, larga e piccola e immature. Esistono alcune variazioni nelle metodologie, anche se il sistema di classificazione menzionato è quello più comunemente impiegato. Campioni normali in umana contengono 60% di cellule normali e 3% di forme immature; il più alto tasso di fertilità è stato ottenuto quando le cellule normali superavano il 40%. Quindi la morfologia degli spermi è il miglior predittore di fertilità, tanto da doverla considerare un parametro standard.

Uno svantaggio della morfologia è costituito dal tempo necessario per completare una analisi, che è relativamente lungo. Tuttavia, con lo sviluppo di computer ad alta velocità, questo problema presto scomparirà. Anche se utilizzata da 10 anni in umana, la valutazione della morfologia con CASA non ha finora consentito di eliminare gli errori di soggettività e variabilità.

CONCLUSIONI

Il CASA ha avuto uno sviluppo considerevole negli ultimi 15 anni, sia in umana che in medicina veterinaria. Questo sistema può fornire precise ed accurate informazioni sulle caratteristiche di mobilità spermatica.

La valutazione della concentrazione non altrettanto attendibile e la morfologia ancora poco studiata. Resta comunque il fatto che si tratta di un efficiente strumento per valutare obiettivamente la fertilità, migliorare la tecnologia di riproduzione e sviluppare studi tossicologici e fisiologici.