

AperTO - Archivio Istituzionale Open Access dell'Università di Torino

Andamento delle prostaglandine F2a (PgF2a) ematiche nella cavalla in relazione all'esito dell'inseminazione artificiale

This is the author's manuscript

Original Citation:

Availability:

This version is available <http://hdl.handle.net/2318/1345> since

Terms of use:

Open Access

Anyone can freely access the full text of works made available as "Open Access". Works made available under a Creative Commons license can be used according to the terms and conditions of said license. Use of all other works requires consent of the right holder (author or publisher) if not exempted from copyright protection by the applicable law.

(Article begins on next page)

ANDAMENTO DELLE PROSTAGLANDINE F_{2α} (PGF_{2α}) EMATICHE NELLA CAVALLA IN RELAZIONE ALL'ESITO DELL'INSEMINAZIONE ARTIFICIALE (IA)

HAEMATIC PROSTAGLANDIN F_{2α} (PGF_{2α}) PATTERN FOLLOWING SUCCESSFUL OR -UNSUCCESSFUL ARTIFICIAL INSEMINATION (AI) IN THE MARE

TIZIANA NERVO¹, *Med Vet, PhD*, **MARIA ELENA FALOMO²**, *Med Vet, PhD*,
GIORGIA CABIANCA³, *Med Vet*, **ELISABETTA FOIS⁴**, *Med Vet*, **LEILA VINCENTI¹**, *Med Vet, PhD*,
ADA ROTA¹ *Med Vet, PhD, Dipl ECAR*

¹Dipartimento di Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino,
Via Leonardo Da Vinci, 44, 10095 Grugliasco (TO)

²Libero professionista, Padova

³Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Padova, Agripolis, 35020 Legnaro (PD)

⁴Libero professionista, Torino

Riassunto

La concentrazione ematica delle prostaglandine F_{2α} (PGF_{2α}) è stata misurata dosando il principale metabolita (PGFM) durante fasi specifiche del ciclo riproduttivo di cinque cavalle fertili e regolarmente cicliche sottoposte ad Inseminazione Artificiale (IA); quotidianamente si è inoltre rilevata la concentrazione del progesterone (P4) per evidenziare un'eventuale insufficienza luteinica. Il livello di PGFM è stato misurato in campioni di sangue prelevati durante finestre temporali di 90 minuti. La prima finestra è stata effettuata all'inizio del calore, la seconda 12h dopo l'ultima IA e le successive nei giorni 5, 6, 7, 12 dopo l'accertata ovulazione. Tre cavalle sono risultate gravide dopo il primo intervento fecondativo, un'altra dopo il secondo, mentre un soggetto è rimasto vuoto dopo due IA. L'analisi della concentrazione di PGFM (valori medi ed area sotto la curva) non ha rivelato una differenza significativa tra cavalle e tra cicli seguiti da gravidanza o no. La concentrazione di P4 non è risultata correlata all'andamento di PGFM. È stata osservata una notevole variabilità tra i soggetti, riguardo sia ai valori basali di PGFM (prima dell'IA), sia a quelli riscontrati nelle determinazioni successive. Nelle fasi del ciclo prese in esame non si è quindi evidenziato che le cavalle non gravide abbiano concentrazioni di PGFM differenti da quelle gravide.

Summary

The release of PGF_{2α} was monitored during specific phases of the reproductive cycle of artificially inseminated mares. Daily progesterone concentration was measured to detect a possible corpus luteus failure. Five fertile and regularly cycling mares were inseminated with fresh semen from a fertile stallion. The PGF_{2α} main metabolite (PGFM) concentration was measured during time windows of 90 minutes at oestrous, 12 hours after the last A.I., and on days 5, 6, 7, 12 following ovulation. Three mares were diagnosed pregnant after the first A.I. session and one mare after the second. The analysis of PGFM concentration (both mean values and area under the curve) did not reveal any significant difference among mares or between pregnant and non-pregnant animals. Progesterone concentration was not correlated to PGFM pattern. There was a high variability among animals, both in basal PGFM values (i.e. before A.I.) and in the subsequent determinations. We found no evidence that barren mares have PGFM concentrations different from pregnant ones in critical phases of the oestrous cycle.

INTRODUZIONE

Nella cavalla, l'introduzione del seme nel corpo dell'utero, sia attraverso monta naturale sia attraverso IA, induce una risposta infiammatoria acuta e fisiologica, nota come "Endometrite post-coitale" (Kotilainen *et al.*, 1994; Troedsson *et al.*, 1995). Gli animali sani eliminano i prodotti dell'infiammazione nell'arco di 24h (LeBlanc *et al.*, 1989), tuttavia alcune cavalle, specialmente pluripare e con più di 14 anni di età, non riescono a superare l'infiammazione e sviluppano un'endometrite persistente (Cadario *et al.*, 1999). In questo caso, i granulociti neutrofili presentano una diminuzione della fagocitosi, a causa di un'insufficiente opsonizzazione nei fluidi uterini (Troedsson *et al.*, 1993). Un meccanismo importante di difesa dell'utero è la "clearance" meccanica dei batteri e delle molecole derivanti dallo stato infiammatorio, attraverso la capacità contrattile del miometrio; è stato dimostrato che le Prostaglandine giocano un ruolo importante nella "clearance" meccanica (Allen e Pycock, 1998; LeBlanc *et al.*, 1994). L'aumento transitorio della concentrazione di PGF_{2α} ed ossitocina, concomitante all'introduzione del seme in utero è importante non solo per il trasporto gametico, ma anche come stimolo alla contrattilità uterina che svolge un ruolo chiave nell'eliminazione dall'utero di fluidi e detriti cellulari. In caso di "clearance" incompleta, l'infiammazione persiste e la concentrazione di PGF_{2α} aumenta, provocando luteolisi prematura e perdita embrionale (Vanderwall *et al.*, 2000).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di monitorare la concentrazione ematica di PGF_{2α}, attraverso il loro metabolita 15-cheto-13,14-diidro-PGF_{2α} (PGFM), durante fasi specifiche del ciclo riproduttivo di cavalle inseminate artificialmente, e di analizzare l'andamento della concentrazione del P4 per evidenziare un eventuale deficit luteinico, concomitante ad alte concentrazioni di PGFM.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato eseguito su cinque cavalle da sella, adulte, fertili e regolarmente cicliche, durante una stagione riproduttiva. Lo sviluppo follicolare e le condizioni uterine sono stati monitorati tramite palpazione ed esame ecografico transrettale; al primo ciclo spontaneo si sono effettuati gli esami batteriologico e citologico per verificare le condizioni sanitarie uterine. All'estro successivo, quando si è osservata la presenza di un follicolo di almeno 35 mm di diametro, le cavalle sono state inseminate con 3x10⁹ spermatozoi progressivamente motili, provenienti da uno stallone di provata fertilità, diluiti in 50 ml di diluente a base di latte scremato. L'IA è stata ripetuta a giorni alterni fino all'ovulazione. I campioni di sangue per la determinazione di PGFM sono stati raccolti al primo calore, prima di procedere all'esecuzione del tampone batteriologico e citologico, 12h dopo l'ultima IA e nei giorni 5, 6, 7 e 12 post-ovulazione. Ogni volta i prelievi sono stati eseguiti mediante un catetere giugulare, durante una finestra temporale di 90 min, secondo lo schema seguente: ogni 5 min per i primi 30 min ed ogni 15 min fino ai 90 min totali. Quotidianamente si è prelevato un campione di sangue per la determinazione del P4. Il san-

gue è stato immediatamente centrifugato ed il plasma stoccato a -80°C fino al momento dell'esecuzione delle analisi. La concentrazione di PGFM è stata determinata con metodo radioimmunologico (RIA) (Granström e Kindahl, 1982), con soglia di rilevamento pari a 60 pmol/l, presso i laboratori del "Department of Obstetrics and Gynaecology", della Swedish University of Agricultural Sciences di Uppsala, Svezia.

La concentrazione del P4 è stata misurata mediante RIA in micropiastre, con un anticorpo policlonale. Il siero anti-progesterone presentava le seguenti reazioni crociate: progesterone 100%, 11α-idrossiprogestosterone 77%, 11β-idrossiprogestosterone 65%, 17α-idrossiprogestosterone 2,9%, 20α-idrossiprogestosterone 0,01%, 20β-idrossiprogestosterone meno dello 0,001%. La sensibilità del test era di 3,1 pg/pozzetto. I coefficienti di variazione intra- ed inter-analisi erano rispettivamente 7,7 e 7,0%.

La diagnosi di gravidanza è stata effettuata ecograficamente 14gg post-ovulazione e le cavalle non gravide sono state reincluse nello studio.

Per ogni finestra di prelievo (11 campioni) si sono calcolate la concentrazione media di PGFM e l'area sotto la curva (AUC), per poter considerare la presenza di picchi occasionali, definiti come valori superiori alla media di 2 volte la deviazione standard (DS) (Kask *et al.*, 1997). L'effetto del giorno e dello stato gravidico sono stati valutati mediante analisi della varianza.

RISULTATI

Gli esami clinici ed ecografici, insieme a quelli batteriologici e citologici, hanno confermato lo stato di salute iniziale del tratto riproduttivo dei soggetti utilizzati. Tre delle cinque cavalle sono risultate gravide dopo la prima serie di IA e solamente una è risultata vuota al termine di due cicli estrali (Tab. 1). L'analisi dei dati non ha rilevato alcuna differenza significativa tra le concentrazioni medie di PGFM o tra le AUC (Tab. 2) in relazione ai giorni di prelievo o allo stato gravidico o non gravidico delle fattrici. Dal momento che non è stato possibile identificare un andamento comune, sono state illustrate le concentrazioni di PGFM e P4 per ciascun animale (Figg. 1 e 2). I valori di PGFM misurati durante ogni singola finestra di prelievo

Tabella 1
Gravidanze dopo la prima e la seconda serie di IA
Il numero di IA è riportato tra parentesi

Cavalla	Prima serie di IA	Seconda serie di IA
Palaga	G* (1)	
Paleggia	G (2)	
Ferdi	G (2)	
Simpatia	NG** (2)	G (1)
Ranger	NG (2)	NG (2)

*G= gravida.

**NG= non gravida.

hanno presentato occasionalmente dei picchi. Le concentrazioni basali di PGFM erano generalmente basse, variando da valori intorno al limite del rilevamento (60 pmol/l) (Fig. 1: Palaga, Ferdi; Fig. 2: Ranger) a valori di 244,7±98,5 pmol/l (media±SD) (Fig. 1: Simpatia), indipendentemente dal risultato dell'IA. La risposta all'introduzione del seme in utero è stata molto variabile: in tre delle quattro cavalle gravide è stato possibile evidenziare un aumento di PGFM

(Fig. 1: Palaga, Ferdi, Simpatia), così come in un ciclo senza gravidanza (Fig. 2: Ranger, seconda sessione di IA). Le concentrazioni di PGFM al momento in cui si suppone che l'embrione, se concepito, arrivi in utero (Giorni 5, 6, 7) sono state altresì molto variabili tra i soggetti, ma generalmente attorno a valori basali, indipendentemente dal successivo esito della diagnosi di gravidanza. Lo stesso può dirsi per la concentrazione di PGFM al giorno 12,

Tabella 2
Andamento della concentrazione ematica di PGFM descritto attraverso i valori dell'area sotto la curva (AUC: pmol/min/l) durante le sei finestre di prelievo della durata di 90 minuti

Cavalla	Valore basale	12 h post-IA	G 5	G 6	G 7	G 12
Palaga	14,4	155,3	27,1	12,8	14,7	17,8
Paleggia	16,7	16,8	12,2	12,0	12,0	14,2
Ferdi	12,1	18,4	18,4	13,2	17,1	18,9
Simpatia 1	33,8	23,8	25,0	37,3	21,5	26,4
Simpatia 2	58,4	58,2	19,6	22,2	31,6	39,8
Ranger 1	12,3	12	12	12	12,0	12
Ranger 2	12	30,2	13,7	12,6	12,0	14,0

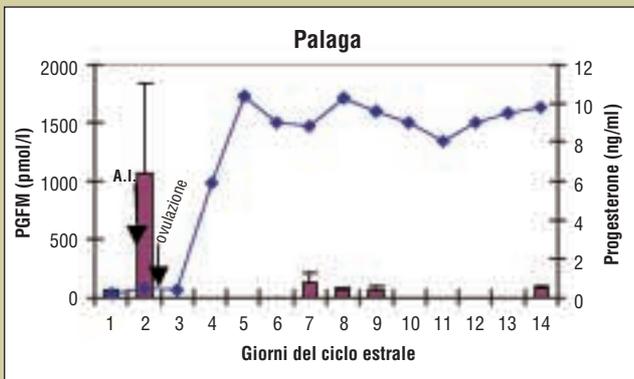


Figura 1A

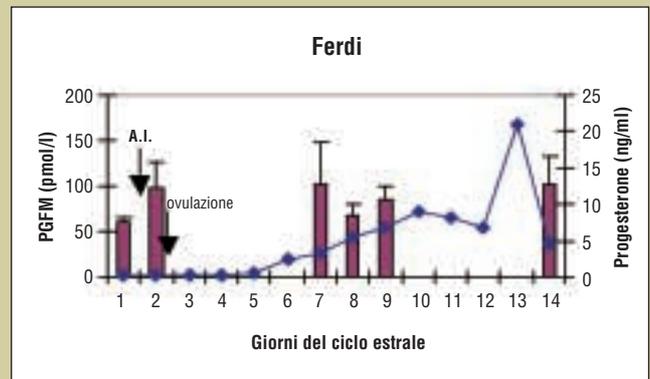


Figura 1C

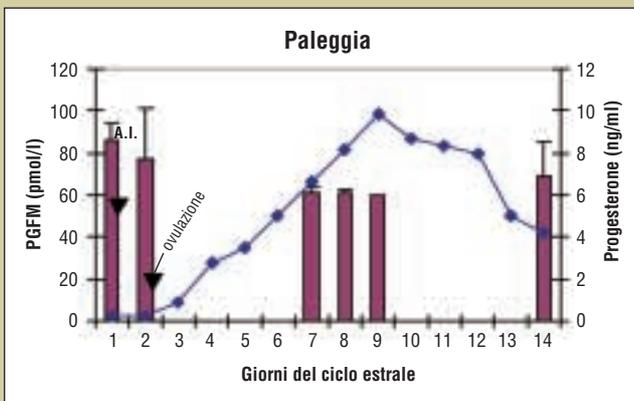


Figura 1B

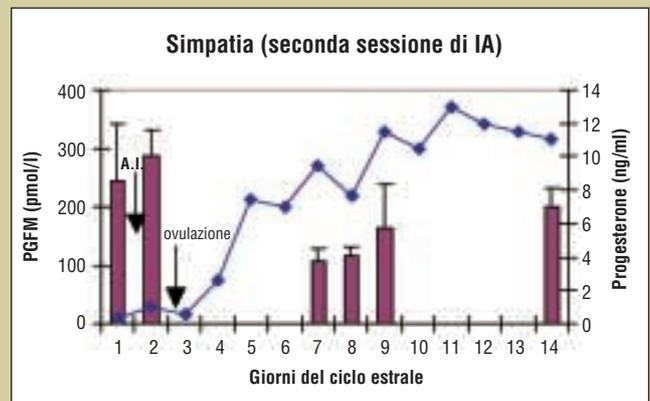


Figura 1D

FIGURA 1A, 1B, 1C, 1D - Cavalle gravide: concentrazione ematica di PGFM (media ± SD) prima dell'IA, 12h dopo l'ultima IA (freccia) e nei giorni 5, 6, 7 e 12 post-ovulazione. La progesteronemia è riportata sull'asse Y secondario. Si noti la rilevante differenza di scala sugli assi Y relativi ai valori di PGFM, dovuta alla forte variabilità tra soggetti.

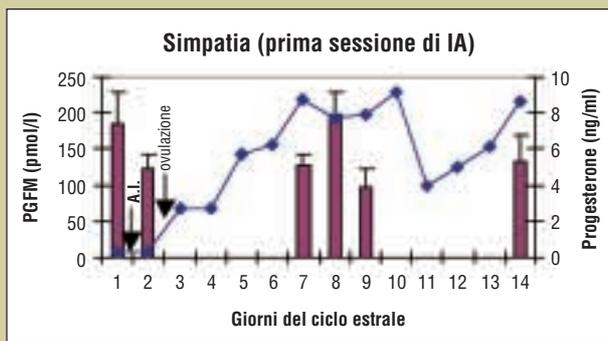


Figura 2A

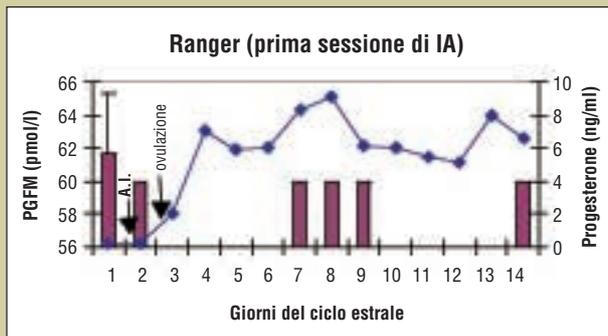


Figura 2B

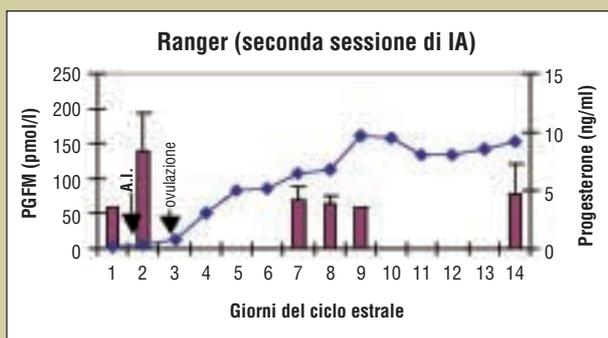


Figura 2C

FIGURA 2A, 2B, 2C - Cavalle non gravide: concentrazione ematica di PGFM (media \pm SD) prima dell'IA, 12h dopo l'ultima IA (freccia) e nei giorni 5, 6, 7 e 12 post-ovulazione. La progesteronemia è riportata sull'asse Y secondario. Si noti la rilevante differenza di scala sugli assi Y relativi ai valori di PGFM, dovuta alla forte variabilità tra i soggetti.

verso la fine della durata del corpo luteo ciclico. Una notevole variabilità tra soggetti è stata osservata anche per le concentrazioni di P4 che hanno raggiunto i valori massimi tra i giorni 7 e 13 post-ovulazione, indipendentemente dallo stato gravidico.

DISCUSSIONE

Uno dei dati che emergono da questo lavoro è l'elevata variabilità tra i soggetti, sia nell'andamento delle concentrazioni di PGFM, sia di P4. Solamente in una fattrice si è osservato un aumento pronunciato della concentrazione di PGFM successivamente all'IA (finestra di campionamento 12h post-IA). Se si considera che l'emivita di PGFM nel sangue è molto breve (circa 5 min: Goff *et al.*,

1984), è possibile che negli altri casi il momento del picco sia sfuggito, anche se i prelievi hanno coperto un periodo di tempo piuttosto lungo. Si può osservare come la risposta più bassa o l'assenza di risposta, pur con differenze non statisticamente significative, caratterizzino le cavalle diagnosticate poi come non gravide: è ipotizzabile che questi soggetti abbiano avuto una risposta insufficiente ad indurre una "clearance" uterina completa, pur senza che questo abbia causato l'insorgenza di un'endometrite persistente. Per essere in grado di produrre elevate quantità di PGF $_{2\alpha}$, l'endometrio deve essere esposto per un certo periodo al P4 (Vernon *et al.*, 1981) e questo potrebbe spiegare la generale bassa risposta di tutte le fattrici, che erano infatti all'inizio della stagione riproduttiva. È stata dimostrata, almeno durante il diestro, (Kask *et al.*, 1997) una variabilità soggettiva nel rilascio di PGF $_{2\alpha}$ in risposta alle manipolazioni del tratto genitale; durante l'estro si evidenzia invece un forte calo nella risposta di PGFM all'aumento dell'ossitocina, probabilmente a causa del numero ridotto di recettori per l'ossitocina durante questa fase del ciclo (Sharp *et al.*, 1997). In uno studio precedente (Starbuck *et al.*, 1998), gli Autori avevano notato che la concentrazione basale di PGFM non era influenzata dallo stato gravidico nei giorni 10, 14 e 18 post-ovulazione, ma nelle cavalle gravide la risposta alla somministrazione di ossitocina era diminuita: durante le fasi iniziali della gravidanza i recettori endometriali per l'ossitocina risultavano essere ridotti.

Bowen *et al.* (1985) non osservarono differenze nella lunghezza del ciclo estrale in cavalle che avevano presentato un aumento della concentrazione di PGFM, suggerendo che il rilascio di PGF $_{2\alpha}$ fosse comunque insufficiente ad indurre luteolisi. In accordo con la ricerca precedente e con altri autori (Starbuck *et al.*, 1998), nel nostro studio anche al giorno 12 post-ovulazione le concentrazioni di PGFM non sono risultate diverse tra i soggetti gravidi ed i non gravidi. La liberazione di PGF $_{2\alpha}$ da parte dell'utero non gravido avviene generalmente intorno ai giorni 14-16 post-ovulazione, corrispondenti al momento in cui avviene generalmente la luteolisi (Neely *et al.*, 1979), ed è stata confermata dal rilevamento di concentrazioni di PGFM più alte nei liquidi ottenuti da "flushing" di uteri di cavalle cicliche rispetto a uteri gravidi, eseguiti in questa epoca (Stout e Allen, 2002).

In conclusione, nel nostro studio non abbiamo riscontrato che cavalle gravide abbiano concentrazioni di PGFM diverse dai soggetti non gravidi, durante fasi specifiche del ciclo riproduttivo, che potrebbero influenzare la funzionalità del corpo luteo. Dai nostri risultati, se, in alcuni casi, l'aumento di PGFM è stato troppo basso per indurre un'adeguata "clearance" uterina, questo potrebbe aver influenzato la sopravvivenza embrionale, ma non ha indotto un'endometrite persistente.

Ringraziamenti

Gli Autori desiderano ringraziare il Prof. Hans Kindahl del Dipartimento di Ostetricia e Ginecologia della Swedish University of Agricultural Sciences di Uppsala (Svezia) per i preziosi suggerimenti e l'indispensabile disponibilità per l'esecuzione degli esami.

Parole chiave

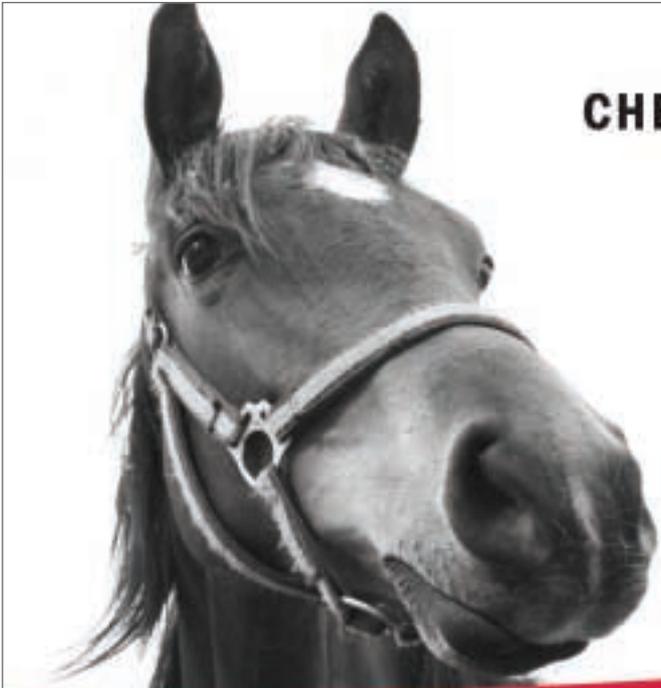
Fattrice, IA, PGF_{2α} progesterone.

Key words

Mare, AI, PGF_{2α} progesterone.

Bibliografia

- Allen WE, Pycocock JF (1998) Cyclical accumulation of uterine fluid in mares with lowered resistance to endometritis. *Vet. Rec.* 122, 489-490.
- Bowen MJ, Salsbury JM, Kraemer DC (1985) Non surgical embryo auto-transfer in the mare. *Equine Vet J. Suppl* 3, 100-102.
- Cadario ME, Thatcher WW, Klapstein E, Merrit AM, Archbald LF, Thatcher MJ, LeBlanc MM (1999) Dynamics of prostaglandin secretion, intrauterine fluid and uterine clearance in reproductively normal mares and mares with delayed uterine clearance. *Theriogenology*. 52, 1181-1192.
- Granström E, Kindahl H (1982) Radioimmunoassay of the major plasma metabolite of PGF_{2α}, 15-keto-13,14-dihydro- PGF_{2α}. *Methods in Enzymology*. 86, 320-339.
- Goff AK, Basu S, Kindahl (1984) Measurements of 11-ketotetranor PGF metabolites: an approach for monitoring prostaglandin F_{2α} release in the mare. *Theriogenology*. 21, 887-896.
- LeBlanc MM, Asbury AC, Lyle SK (1989) Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. *Am J Vet Res.* 6, 864-867.
- LeBlanc MM, Neuwirth L, Asbury AC, Tran T, Mauragis D, Klapstein E (1994) Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. *Equine Vet. J.* 26, 109-113.
- Kask K, Odensvik K, Kindahl H (1997) Prostaglandin F_{2α} release associated with an embryo transfer procedure in the mare. *Equine Vet J.* 29, 287-289.
- Kotilainen T, Huhtinen M, Katila T (1994) Sperm induced leukocytosis in the equine uterus. *Theriogenology*. 41, 629-636.
- Neely DP, Kindahl H, Stabenfeldt GH, Edqvist LE, Hughes JP (1979) Prostaglandin release patterns in the mare: physiological, pathophysiological, and therapeutic responses. *J Reprod Fert.* 27 (Suppl), 181-189.
- Sharp DC, Thatcher MJ, Salute ME, Fuchs AR (1997) Relationship between endometrial oxytocin receptors and oxytocin-induced prostaglandin F_{2α} release during the oestrus cycle and early pregnancy in pony mares. *J Reprod Fert.* 109, 137-144.
- Starbuck GR, Stout TAE, Lammung WR, Allen WR, Flint APF (1998) Endometrial oxytocin receptor and uterine prostaglandin secretion in mares during the oestrous cycle and early pregnancy. *J Reprod Fert.* 113, 173-179.
- Stout TAE, Allen WR (2002) Prostaglandin E2 and F_{2α} production by equine conceptuses and concentrations in conceptus fluids and uterine flushings recovered from early pregnant and dioestrous mares. *Reproduction*. 123, 261-268.
- Troedsson MHT, Liu IKM, Thurmond M (1993) Immunoglobulin (IgG and IgA) and Complement (C3) concentrations in uterine secretions following an intrauterine challenge of *Streptococcus zooepidemicus* in mares susceptible and resistant to chronic uterine infection. *Biol. Reprod.* 49, 502-506.
- Troedsson MHT, Steiger BN, Ibrahim NM, Foster DN, Crabo BG (1995) Mechanism of sperm induced endometritis in the mare. *Biol. Reprod.* 52 (Suppl), 307.
- Vanderwall DK, Betschart RW, Squires EL (2000) Effect of PGF_{2α} and 15-keto-13,14-dihydro- PGF_{2α} (PGFM) on corpora lutea function in nonpregnant mares. *Theriogenology*. 53, 1263-1271.
- Vernon MW, Zavy MT, Asquith RL, Sharp DC (1981) Prostaglandin F_{2α} in the equine endometrium: steroid modulation and production capacity during the estrous cycle and early pregnancy. *Biol Reprod.* 25, 581-589.



CHECK-UP COMPLETO

Urea	Trigliceridi
Creatinina	Proteine totali
Sodio	Albumina
Potassio	Globuline
Fosfati	Glucosio
Bilirubina (totale)	α-amilasi
ALT (GPT)	Fruttosamine
ALP	CK
GGT	LDH
AST (GOT)	Calcio
GLDH	Magnesio
Colesterolo	

TUTTO QUESTO
AL PREZZO DI
22,75 €

Informazioni complete per diagnosi, monitoraggio e prevenzione nei Vostri pazienti.

Questo profilo, il più conosciuto del nostro laboratorio, necessita di solo 1 ml di siero, 0,5 ml di sangue EDTA ed uno striscio ematico.

Quadro ematico completo:
Eritroci, emoglobina, ematocrito, MCV, HBE, MCHC, leucociti con conta differenziale di neutrofili banda, neutrofili segm., linfociti, monociti, eosinofili e basofili, conta piastrinica, valutazione di cellule atipiche, anisocitosi, policromasia.

LABORATORIO PER MEDICI VETERINARI

Vet-Med-Lab

Per ulteriori informazioni:
 Vet-Med-Lab s.r.l. - responsabile Italia:
 Dr. Christiana Schmidt
 Via Tolarelli 16/1 - 21030 Casier (TV)
 Tel: 0422-813851 - Fax: 0422-870580
 e-mail: c.schmidt@vetmedlab.com

www.vetmedlab.com