

SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN
FISIOPATOLOGIA DELLA
RIPRODUZIONE DEGLI ANIMALI
DOMESTICI

**REPEAT BREEDER.
EZIOPATOGENESI,
DIAGNOSI, TERAPIA**

Prof. Raffaele Luigi Sciorsci



Definizione

Bovine clinicamente sane, con un ciclo estrale regolare, che non risultano gravide dopo 3 o più interventi fecondativi.

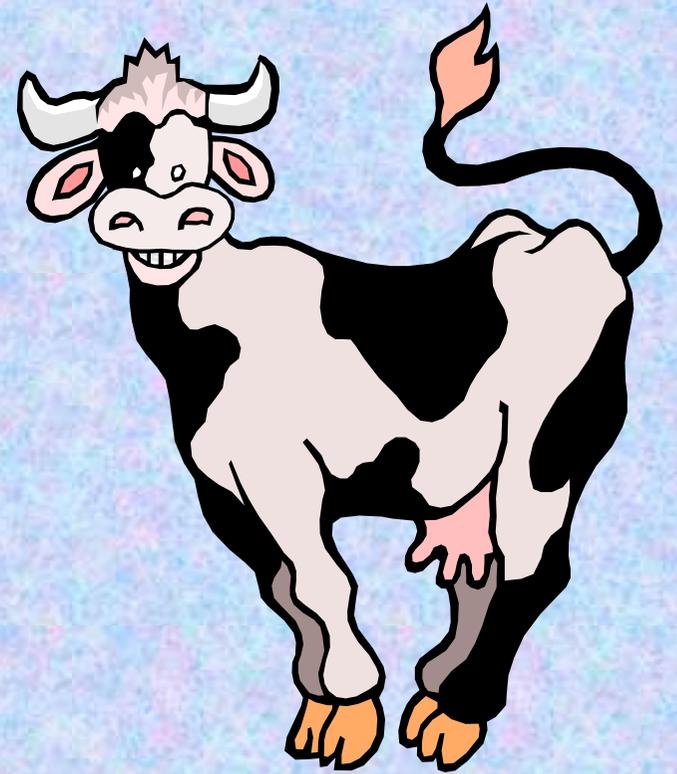


(Arthur, 2001)

In un allevamento con una normale fertilità, dove i concepimenti sono comunemente del 50-55%, circa 6-24% delle bovine sono *repeat breeders*.

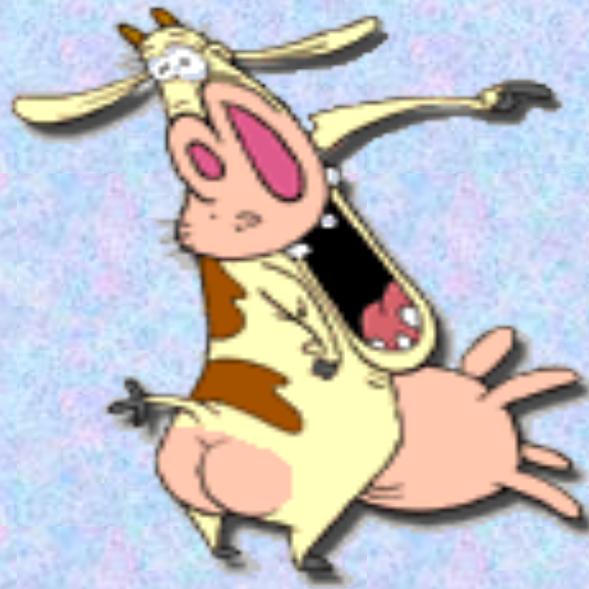
- Perdite economiche:

- inseminazione
- aumento dell'intervallo parto-concepimento
- trattamenti veterinari



Fattori predisponenti

- età delle bovine: soggetti di età > 5 anni
- elevata produzione latte: stress manageriale e nutrizionale
- valori estremi nel body condition score



Eziopatogenesi



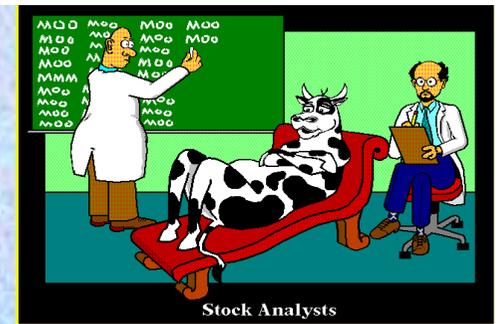
Mancato concepimento:

- ritardata ovulazione;
- qualità scadente del seme;
- errata scelta del momento per la FA;
- impedimenti fisici e funzionali alla migrazione dei gameti;
- reazioni immunologiche;
- elevate temperature ambientali.



Mortalità embrionale:

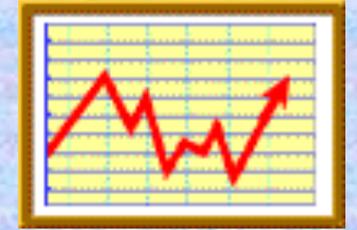
- fecondazione con gameti invecchiati;
- anomalie cromosomiche letali;
- errata alimentazione, sia per eccesso di proteine che per carenza di glucosio, fosforo, rame, cobalto, iodio, manganese, vitamina A, beta-carotene;
- carenza di progesterone;
- stress;
- stress ossidativo.



Bovine RB presentano:

- un ciclo estrale asincrono dal punto di vista ormonale
- estro prolungato
- prolungata vita del follicolo preovulatorio
- ritardo nel picco di LH
- livelli soprabasali di progesterone nella fase peri-ovulatoria (0.15 - 0.32 ng/ml)
- raggiungimento più lento del picco plasmatico di progesterone

(Bage et al., 2002)

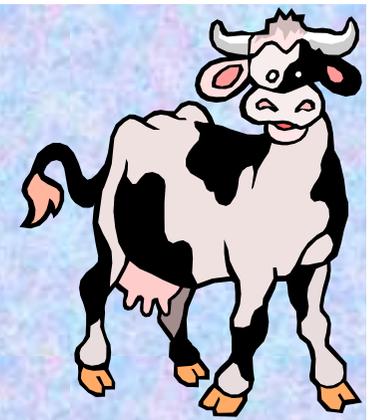


Un aumento marginale nelle concentrazioni di P4 determina:

- un'alterata espressione delle manifestazioni estrali
- una disendocrinia
- irregolare maturazione dell'oocita
- malfunzionamento nel trasporto dei nemaspermi
- errata temporizzazione dell'incontro tra i gameti

Queste variazioni si ripercuotono sul microambiente del follicolo preovulatorio, agendo negativamente sulla maturazione finale dell'ovocita.





Gli embrioni di bovine RB, infatti, si presentano:

- più piccoli
- morfologicamente alterati
- con anomala differenziazione cellulare

(Bage et al., 2002)



- Aberrazioni cromosomiche visibili al microscopio elettronico, sono state rilevate nel 5-10% di embrioni bovini.
- Tali aberrazioni possono avvenire a livello molecolare (es. mutazioni) e causare problemi di ricombinazione genetica dei genomi, al momento della fecondazione

embrione di bovina normale



in bovina RB



no gravidanza

embrione di bovina RB



bovine normali



si gravidanza

(Silke et al., 2002)

- L'Epidermal Growth Factor (EGF) riveste un ruolo primario nello stabilirsi della gravidanza.
- Effetti:
 - formazione della placenta
 - sulla vitalità del conceptus
 - aumenta la produzione di prostaglandine



-  EGF: nei giorni 2-4 e 13-14 del ciclo estrale di bovine normali.
-  EGF: nei giorni 3 e 14 in bovine RB.

Il mancato aumento nelle bovine RB potrebbe:

- alterare la regolazione dell'attività uterina
- influenzare lo sviluppo della blastocisti
- influenzare la funzione del CL.

La differenza tra RB e bovine normali nelle concentrazioni di EGF in biopsie endometriali potrà, quindi, essere considerato un marker per diagnosticare le bovine RB.



Deficienza luteale

La relazione esistente tra le concentrazioni di progesterone e il tasso di gravidanza è stata valutata in molte circostanze e i risultati sono stati spesso discordanti.



- dal 6° al 10° giorno dall'estro: differenze nella concentrazione di progesterone fra vacche che hanno concepito, vacche fecondate che non hanno concepito e vacche non fecondate (Hansel et al., 1981)
- le differenze tra questi tre gruppi di vacche non sono risultati evidenti fino alla fase medio-luteale (Parkinson e Lamming, 1990)
- non sono state trovate differenze fino al momento della luteolisi (Arthur, 2001)

- Il progesterone interagisce con specifici **recettori (PR)**, i quali si presentano con due isoforme, "**A**" e "**B**": l'effetto biologico di quest'ormone dipende dall'attivazione di entrambe le sue isoforme recettoriali.

(Conneely et al., 2001)

- **L'isoforma A** risulta implicata in gravi anomalie della funzione ovarica e uterina, comprese anche forme di infertilità
- **L'isoforma B** ha attività tessuto-specifica ed è implicata nella risposta di tipo proliferativo della ghiandola mammaria.



Stress

Molti fattori nei moderni allevamenti sono stati identificati come potenziali cause stressogene:

- elevata produzione latte
- disordini del postpartum
- stato nutrizionale
- infiammazioni
- infezioni
- fattori sociali
- trasporti
- temperature elevate.



Manze trattate con ACTH nel periodo preovulatorio presentavano:

- elevate concentrazioni di P4
- inibizione del picco di LH
- comportamento estrale, molto simile a quello detenuto nelle RB



(Bage et al., 2000)

Con l'incremento delle somministrazioni di ACTH:

- la produzione di cortisolo rimaneva costante
- le concentrazioni di P4 diminuivano progressivamente

I risultati di questi esperimenti, suggeriscono che una componente della sindrome RB potrebbe essere la continua stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene.

In situazioni stressanti si verifica un concomitante aumento delle beta-endorfine che, oltre i limiti fisiologici:

- inibiscono i canali per il calcio
- un deficit di calcio endocellulare ed endotissutale
- modifica della funzionalità endocrina
- blocco della sintesi e del rilascio di GnRH

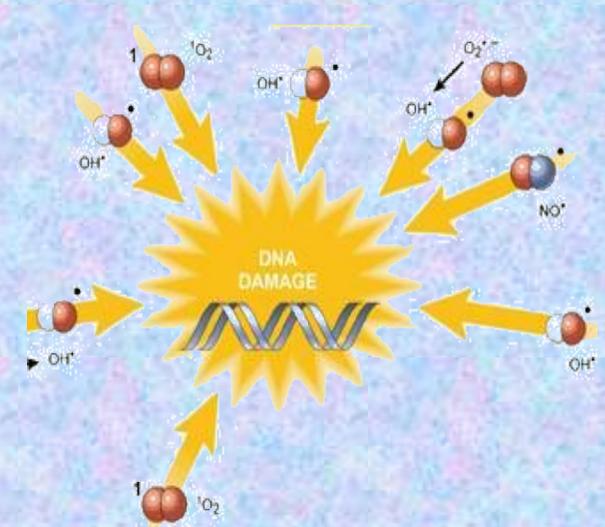
(Wang et al., 1999; Sciorsci et al., 2000)

Stress ossidativo

I radicali liberi sono molecole o atomi che contengono uno o più elettroni spaiati, che tendono a reagire molto facilmente con altre specie chimiche allo scopo di acquisire un altro elettrone, così da poter stabilizzare l'orbitale

I radicali agiscono su:

- fosfolipidi di membrana
- glucidi
- proteine
- DNA



(Cuzzocrea et al., 2001)

I radicali liberi intervengono:

- nell'ovulazione
- nella formazione del corpo luteo
- nella steroidogenesi
- nel processo di apoptosi e luteolisi

(Shakovski e Tsafiri, 1994; Jablonka-shariff e Oslon, 1997)

Le cellule si proteggono dal danno dei ROS con l'attività di **enzimi** (superossido dismutasi, catalasi e glutathione perossidasi) o con **antiossidanti** (vitamina A, C ed E, o precursori della vitamina A, beta-carotene).

(Carlson et al., 1993; Fiona M.Y., et al., 1995)

Il beta-carotene puo' servire:

- a proteggere le ovaie e l'utero dal danno ossidativo
- ad aumentare le concentrazioni di P4
- nella produzione di proteine uterine importanti per la sopravvivenza degli embrioni.



- A causa di situazioni stressanti si potrebbe verificare, nelle bovine repeat breeder, durante il periodo critico per la sopravvivenza del CL, un aumento nella concentrazione dei radicali liberi, responsabili della lisi del CL e, quindi, della mancata gravidanza.
- E' possibile che vi sia un reale sinergismo di potenziamento tra le diverse componenti stressogene (radicali liberi e beta-endorfine) nell'indurre la lisi precoce del CL nelle bovine repeat breeder.

BOVINE	N° SOGGET TI	B-END (ng/ml) 12°g (M ± DS)	B-END (ng/ml) 16°g (M ± DS)	ROS (U.carr) 12°g (M ± DS)	ROS (U.carr) 16°g (M ± DS)	P4 (ng/ml) 12°g (M ± DS)	P4 (ng/ml) 16°g (M ± DS)
REPEAT BREEDER VUOTE	21	0.51±0.12	0.59±0.14	93.73±13.8	93.85 ± 8.76	0.5 ± 0.11	0.52 ± 0.12
NORMALI VUOTE	15	0.2±0.05	0.34±0.12	55.13 ± 10.5	56.53 ± 3.37	0.9 ± 0.07	0.9 ± 0.15

BOVINE	N° SOGGET TI	B-END (ng/ml) 12°g (M ± DS)	B-END (ng/ml) 16°g (M ± DS)	ROS (U.carr) 12°g (M ± DS)	ROS (U.carr) 16°g (M ± DS)	P4 (ng/ml) 12°g (M ± DS)	P4 (ng/ml) 16°g (M ± DS)
REPEAT BREEDER GRAVIDE	9	0.34± 0.04	0.46±0.04	51.96 ± 4.9	55.3 ± 4.81	4.19 ± 1.1	4.65 ± 0.54
NORMALI GRAVIDE	15	0.3± 0.08	0.42±0.18	45.13 ± 7.18	49.16 ± 5.4	4.7 ± 0.78	5.6 ± 0.53

Concentrazioni medie di B-end, radicali liberi e P4 nelle bovine repeat breeder e nelle bovine normali.

Terapia

Per migliorare lo sviluppo e la funzione del corpo luteo si è utilizzato

- **progesterone e progestinici** (Arthur, 2001; Ballabio et al. 2002)
- **hCG** (Walton et al., 1990)
- **GnRH** (Morgan e Lean, 1993)
- **insulina** (Selvaraju et al., 2002)
- **GnRH e Calcio-Naloxone (Ca/Nx)** (Robbe et al., 2001)
- **PGF2 α** (d-cloprostenolo - Dalmazin, Fatro-Italia) (Rizzo et al., 2003).

- Secondo Conneely et al. (2001) l'esistenza di due isoforme recettoriali per il P4 (A e B), ognuno con una funzione ed una distribuzione diversa, potrebbe spiegare il fallimento della somministrazione esogena di **progestinici**.



L'utilizzo del **GnRH** 12 giorni dopo la F.A. ha dato risultati piuttosto incoraggianti perché:

- induce la luteinizzazione del follicolo dominante durante la seconda ondata follicolare
- aumenta la progesteronemia
- riduce il tasso di estrogeni in circolo
- previene l'aumento dei recettori endometriali per l'ossitocina e, quindi, la stimolazione della produzione uterina di $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Cairolì, 2002).

L'**insulina** potrebbe avere un effetto positivo sulla fertilità delle RB, in quanto favorirebbe:

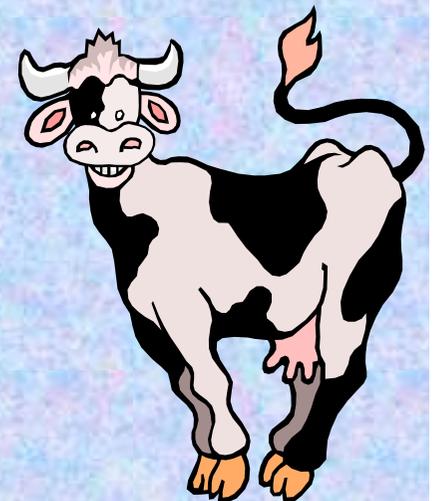
- la crescita follicolare
- la qualità degli oociti
- l'iniziale sviluppo embrionale.



GnRH+Ca/Nx:

- antagonizza gli oppioidi endogeni, eventualmente presenti a livello ipotalamo-ipofisario ed ovaio
- ripristina l'invio e la normale trasduzione dei messaggi endocrini
- il GnRH esogeno normalizza l'assetto endocrino relativo alla fase preovulatoria ed ovulatoria del ciclo.

- Le **PGF2 α** svolgono un'azione trofica sul CL in via di formazione determinando un aumento delle concentrazioni plasmatiche di progesterone e del diametro del CL e, pertanto, un miglioramento dei tassi di concepimento (52% nel gruppo trattato vs 25% nel gruppo controllo).



- Una conferma indiretta di quanto affermato viene dall'analisi dei dati ottenuti nel gruppo di bovine sane e normalmente cicliche trattate con l'indometacina, un inibitore selettivo delle ciclossigenasi e, pertanto, delle PgF2 α .
- L'importanza delle COX sulla funzione riproduttiva è stata anche avvalorata da Lim et al. (1997), che dimostrarono che topi knockout per il gene COX-2 risultavano infertili, con un'alterata ovulazione, fertilizzazione, impianto dell'embrione e deciduazione.

Le PgF2 α attivano il processo di sintesi del P4:

- a partire dalle lipoproteine per attivazione della **citocromossidasi P450_{scc}** (Meidan et al, 1998)
- agendo sulla **StAR** (Steroidogenic Acute Regulatory), una proteina a turnover rapido, che agisce accelerando il trasferimento di colesterolo dalla membrana esterna a quella interna del mitocondrio (Leymarie e Martal, 2001).

- Sarebbe riduttivo improntare il programma di miglioramento del tasso di concepimento solo su un unico protocollo farmacologico, in quanto alla base dell'ipofertilità negli allevamenti bovini ci sono una serie di problematiche, di tipo principalmente manageriale, che portano inevitabilmente l'animale a subire continui stress, che si ripercuotono poi sulle stesse produzioni.



GRAZIE

PER LA CORTESE

ATTENZIONE