

TERAPIA DELLE CISTI FOLLICOLARI DELLA BOVINA CON GnRH ASSOCIATO A CALCIO E NALOXONE PER VIA EPIDURALE

TREATMENT OF OVARIAN FOLLICULAR CYSTS IN DAIRY COWS WITH EPIDURAL GnRH AND CALCIUM – NALOXONE ADMINISTRATION

Cinone M. ¹Coronati D., ²Minoia G., ²Guaricci A.C., ²Minoia R., ³De Cosmo A.M., ⁴Robbe D. - *Dip. di Scienze Animali, Vegetali e dell'Ambiente - Università del Molise – ¹Cirio Agroalimentari Azienda Fagianeria - Piana di Monte Verna (CE) – ²Dip. di Produzione Animale – Università di Bari – ³Dip. di Scienze Ambientali – Università di Camerino – ⁴Dip. di Scienze Cliniche Veterinarie- Università di Teramo*

Parole Chiave: cisti follicolare, bovina, GnRH, calcio/naloxone, epidurale.

Key Words: follicular cysts, cattle, GnRH, calcium/naloxone, epidural.

SUMMARY - Cystic ovarian disease (COD) are anovulatory follicular like dynamic structures that occur in 5 to 30% of dairy cows. Their development is likely associated with altered hypothalamic-hypophysial-ovarian function. In any type of stress, β -endorphins increase and interplay with metabolic processes. In COD, it has been reported that β -endorphins are linked to the gonadotropin receptors and block GnRH and LH pulse. In order to directly remove endogenous opioids linked to the ovary, by activating hypogastric plexus at lombo sacral level, we used an epidural administration of GnRH and calcium /naloxone.

INTRODUZIONE – Il miglioramento genetico delle bovine da latte altamente produttive e lo sviluppo delle condizioni manageriali negli allevamenti intensivi hanno consentito un aumento di produttività a discapito della fertilità di mandria prolungando l'intervallo parto-concepimento¹. Le cisti follicolari della bovina o *cystic ovarian disease* (COD), la cui eziopatogenesi è polifattoriale, sono strutture ovariche anovulatorie con diametro >2.5 cm che persistono per oltre 10 gg. con tendenza a recidivare o regredire spontaneamente; esse rappresentano una tecnopatia di più frequente riscontro (5-30%) negli allevamenti di bovine ad alta produzione latte². Tra le cause d'insorgenza delle COD, la più importante è la disfunzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio attribuita ad anomalie del metabolismo *post-partum*. L'alterazione primaria è la carenza di LH preovulatorio e di GnRH, in risposta all'aumento degli estrogeni³. L'insorgere di patologie endorfino-mediate nel *post-partum* possono essere determinate da variazioni di legami nel sistema ormone-recettore e sono in rapporto con l'aumento degli oppioidi endogeni ed alterato *turnover* del calcio⁴. L'esistenza di un controllo oppioidergico sul sistema neuroendocrino ipotalamico-ipofisario può essere antagonizzato ottenendo un aumento dei *pulses* di GnRH e conseguente aumento della secrezione di LH⁵. Qualsiasi condizione di stress comporta un aumento di ACTH, cortisolo, catecolamine, oppioidi endogeni ed asincronia nell'induzione dei recettori per l'LH sulle cellule della granulosa e della teca durante la maturazione follicolare⁶. Sulla base di tali acquisizioni, al fine di ottenere un'azione terapeutica nel ripristino funzionale di bovine con COD, abbiamo somministrato l'associazione farmacologica GnRH e calcio/naloxone per via epidurale.

MATERIALI E METODI – La prova sperimentale è stata effettuata nell'allevamento "La Fagianeria" di bovine da latte pezzata nera olandese, con un incidenza annua di cisti ovariche del 10-15%. L'alimentazione preparata con sistema *unifeed*, era costituita da fieno di erba medica, cotone, insilato di mais e di loietto, integratori vitaminici ed oligo minerali (42,6kg/capo/die; umidità 48%; 0.83 U.F./kg s.s.; 17.5% proteine s.s.). La

produzione media di latte era di 36 l (grasso 3.6%; proteine 3.21%). Le bovine suddivise in base alla fase riproduttiva ed allevate a stabulazione semi-permanente, erano alimentate con sistema *unifeed* e monitorate per la gestione della mandria (calori e produzione) con sistema computerizzato Afimilk[®] v3.0 2D (SAE Afikim) programmato per tre mungiture giornaliere. Alla visita ginecologica, sono state individuate 40 bovine di 3-9 anni, con peso medio di 600 kg in buone condizioni di nutrizione (BCS=3), che presentavano su una o entrambe le ovaie, formazioni similfollicolari di diametro >2.5 cm, persistenti per almeno 10 gg., in assenza di corpo luteo funzionante, con un intervallo parto-concepimento di 2-10 mesi. La diagnosi di COD è stata confermata mediante esame ecografico (ScannerVet 480, sonda lineare transrettale 5-7.5 MHz, PieMedical). Le bovine sono state suddivise in 2 gruppi in base al differente trattamento farmacologico. Gruppo A: somministrazione per via epidurale sacro-coccigea di 2 ml di GnRH (25 ng/ml lecirelina Dalmarelin[®], Fatro) e 3 ml di calcio e naloxone (0.6 mg naloxone cloridrato, Diosynt disciolti in 3 ml di calcio gluconato al 20%, Calcio pH[®], Fatro) in 30 bovine al 10° gg. dalla diagnosi di COD. Dopo 21 gg. in assenza di calore, è stata determinata in allevamento la concentrazione plasmatica del progesterone (P4) con kit semiquantitativo ELISA (Ovulation test, BVT Diagnostic Veterinaire) e in presenza di P4<1 ng/ml si è ripetuto il trattamento suddetto. Gruppo B: 10 bovine di controllo trattate con 5 ml di soluzione fisiologica (0,9 % NaCl) /capo per via epidurale. Tutte le bovine sono state sottoposte a prelievi ematici dalla vena coccigea con provette (Vacutainer) da siero e da plasma con K₃E + aprotinina (Sigma-Aldrich) mantenute a 4°C e centrifugate con centrifuga refrigerata a 2500 rpm x 10'; le aliquote sono state stoccate a -20°C fino al momento dell'analisi in laboratorio. Per il dosaggio della β -endorfina, i prelievi ematici sono stati effettuati al giorno 0 (visita clinica con sospetto di COD), 10° (conferma di COD e trattamento), 11°, 12°, 17°, mentre per valutare l'LH, sono stati eseguiti prelievi al tempo 0, 30', 60', 120', 180' dal trattamento farmacologico (G 10). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica con *t* di Student. Il dosaggio della β -endorfina è stato effettuato mediante uno spettrofotometro a micropiastra (Brio Radim) usando un kit EIA (β -endorfin, Peninsula Lab.) e per l'LH ematico un kit ELISA (LH Detect, INRA). Le bovine in calore dopo trattamento sono state visitate e fecondate con seme proveniente da centri specializzati per la conservazione (Semex). La risposta farmacologica è stata considerata positiva quando la bovina ha manifestato l'estro (tasso e tempo di guarigione) seguito dal rilievo ecografico di un corpo luteo, in assenza di strutture cistiche. Dopo 30 e 60 gg. si è proceduto alla diagnosi clinica di gravidanza manuale ed ecografia (tasso di gravidanza).

RISULTATI – Dopo il trattamento con GnRH+Ca/Nx, 9/30 (30 %) bovine con COD (Gruppo A) hanno presentato un calore dopo 18±3 giorni. Al 21° giorno dal trattamento, 21/30 (70 %) bovine non hanno mostrato alcun segno di calore, di queste 6/21 bovine hanno presentato un valore del progesterone <1ng/ml, per cui sono state ritratte con GnRH+Ca/Nx e hanno manifestato un estro dopo 29±7.5 giorni dal primo trattamento. Le altre 15/21 bovine hanno presentato un tasso di progesterone >2ng/ml. Le gravidanze nei soggetti del Gruppo A sono state del 66 % (10/15). Nelle bovine del Gruppo B non sono state osservate modificazione delle cisti. La scelta di sottoporre a trattamento anche le bovine che presentavano COD recidivanti è stata dettata dalla necessità di recuperare la fertilità dei soggetti con cisti ovariche ribelli al trattamento farmacologico classico con GnRH o HCG per via i.m.. Risultati di particolare rilievo sono stati ottenuti sul dosaggio dell'LH delle bovine con COD dopo trattamento con GnRH+Ca/Nx (Graf. 1). I prelievi sequenziali effettuati nel protocollo sperimentale hanno permesso di tracciare una curva di secrezione dell'LH che da 0,33±0,13 ng/ml (T0) ha raggiunto 1,98±1,35 (T30') 3,12±1,68 (T60') e 8,74±5,02 (T120') ed infine 10,1±4,98 ng/ml

(T180') tutti dati altamente significativi ($p < 0.001$). Il dosaggio della β -endorfina ha permesso di rilevarne un singolare incremento subito dopo il trattamento con GnRH+Ca/Nx (Graf. 2). Da un valore iniziale di $0,76 \pm 0,31$ ng/ml (G0) si è raggiunto $1,88 \pm 1,02$ (G10°) per poi decrescere fino a $0,73 \pm 0,36$ (G12°) e $0,53 \pm 0,2$ ng/ml (G17°) valori che comparati fra di loro sono risultati altamente significativi ($p < 0.001$).

Grafico 1 - Concentrazione dell'LH in bovine con cisti follicolari dopo trattamento con GnRH e Ca/Nx (t di Student a,b; b,d; b,e $P < 0.001$ – b,c $P < 0.05$).

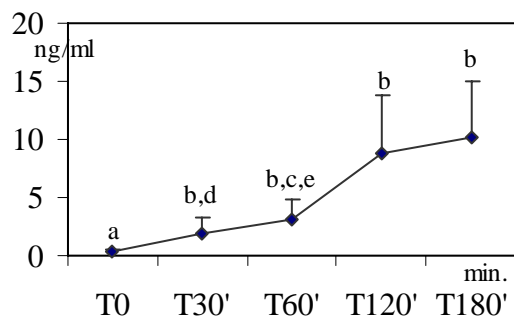
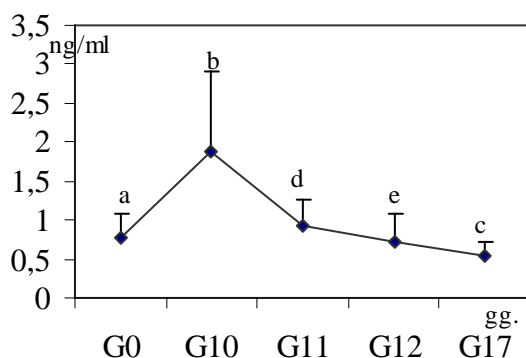


Grafico 2 - Concentrazione di β -endorfina in bovine con cisti follicolari dopo trattamento con GnRH e Ca/Nx (t di Student a,b; b,c; b,e $P < 0.001$ – c,d $P < 0.01$ – a,c; b,d $P < 0.05$).



DISCUSSIONE – Lo schema terapeutico proposto è finalizzato al ristabilimento di un ciclo normale, attraverso la formazione di un nuovo corpo luteo funzionante che consegue alla luteinizzazione della cisti follicolare in risposta allo stimolo dell'LH. Il controllo oppioidergico sul sistema neuroendocrino ipotalamico-ipofisario può essere antagonizzato con la somministrazione di Ca/Nx, ottenendo un aumento dei pulses di GnRH e conseguente aumento della secrezione di LH, come è stato confermato dal dosaggio dell'LH. L'aumento notevole della β -endorfina, in particolare della frazione legata, determina un blocco dei gates per il calcio, con conseguente blocco degli scambi di ioni Ca^{++} attraverso la membrana cellulare. Precedenti studi clinici condotti dall'Unità di Bari avevano già confermato l'efficacia del trattamento GnRH+Ca/Nx per via epidurale nelle COD, dimostrando il ruolo prioritario svolto dal plesso ipogastrico nel modificare l'attività dei recettori ovarici per il GnRH e le gonadotropine⁷. Non sono riportati in letteratura dati sui peptidi oppioidi endogeni nelle patologie ovariche. Questo è il primo studio che riporta una valutazione della β -endorfina in corso di cisti ovariche prima e dopo trattamento farmacologico con GnRH+Ca/Nx, evidenziando il legame esistente tra oppioidi endogeni e pulsatilità dell'LH dopo somministrazione di GnRH+Ca/Nx.

BIBLIOGRAFIA – 1. Romagnoli, S. Stress e Fertilità. In Sali, G.: *Manuale di Teriogenologia bovina*. Edagricole, Bologna, 345-373 (1996). 2. Parkinson, T.J. Infertility in the cow. In Noakes, D.E. et al.: *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. W.B. Saunders, London, 8thEd., 431-443 (2001). 3. Silvia, W.J., Hatler, T.B., Nugent, A.M., Laranja da Fonseca, L.F. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis.

Domest. Anim. Endocrinol. 23(1-2): 167-177 (2002). **4.** Minoia, P., Sciorsci, R.L. Metabolic control through L calcium channel, PKC and opioid receptors modulation by an association of naloxone and calcium salts. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* 1(2): 131-7 (2001). **5.** Sciorsci, R.L., Bianchi, P., Minoia, P. High levels of endorphin and related pathologies of veterinary concern. A review. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 22(4): 575-626 (2000). **6.** Vanholder, T., Opsomer, G., De Kruif, A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairly cattle: a review. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 105-119 (2006). **7.** Robbe, D., D'Ottavio, M., Sciorsci, R.L., Terapia delle cisti follicolari della bovina. *Obiett. Doc. Vet.* 7/8: 19-24 (2002).