

Sommario

Riassunto.....	3
1 INTRODUZIONE.....	4
1.1 Fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo.....	10
Ipotalamo.....	10
Ipofisi	13
Testicoli.....	15
Pene	17
Testosterone.....	19
Azione del testosterone.....	21
1.2 Comportamento aggressivo e territorialità.....	23
1.3 Fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaia	27
Ovulazione indotta in assenza di accoppiamento	28
Ovaie.....	28
Vagina, vestibolo e vulva	29
1.4 Fisiologia della riproduzione nella gatta.....	30
Stagione riproduttiva e pubertà	30
Ciclo riproduttivo	31
Manifestazioni comportamentali della gatta in estro	34
1.5 La citologia vaginale nella gatta	36
1.6 Scopo della tesi.....	37
2 MATERIALI E METODI	39
2.1 Animali sperimentali.....	39
2.2 Protocollo sperimentale	41
2.3 Dosaggio di testosterone e progesterone	47
2.4 Citologia vaginale.....	48
2.5 Controlli	48

2.6 Modulo etologico e valutazioni comportamentali	49
2.7 Analisi statistica	50
3. RISULTATI	51
3.1 Visita clinica e dosaggi ormonali nel maschio	52
Concentrazione sierica del testosterone	56
Stimolazione pre-impianto	59
Stimolazione post-impianto.....	59
Andamento del valore basale del testosterone al momento dell’impianto e nei mesi successivi	60
Misurazione dei testicoli.....	66
Variazioni nella presenza delle spicole peniene	69
Variazioni del peso corporeo dei soggetti	70
3.2 Risultati del modulo etologico.....	72
3.3 Esame istologico del sito di impianto e dei testicoli del soggetto n°6	77
3.4 Visita clinica e dosaggi ormonali nella femmina	78
Concentrazione sierica del progesterone.....	81
Stimolazione post-impianto.....	83
Andamento del valore basale del progesterone al momento dell’impianto e nei mesi successivi	84
Risultati della citologia vaginale	85
Variazioni del peso corporeo dei soggetti	87
3.5 Modulo etologico	88
4. DISCUSSIONE	93
5. CONCLUSIONI	102
6. Allegati.....	105
7 Bibliografia.....	111
8. Ringraziamenti.....	117

Riassunto

Lo studio è stato effettuato su un campione di 12 animali, 7 maschi e 5 femmine, adulti, interi, di età compresa tra i 7 mesi e i 6 anni, di peso e provenienza diversa, ma tutti di razza Europea. Effettuata una visita clinica preliminare con esame obiettivo generale e particolare dell'apparato riproduttore, si è praticata la stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi con GnRH per determinare, un'ora dopo la somministrazione, l'effettivo picco del testosterone nel maschio, mentre nella femmina si è dosato il progesterone. A tutti i soggetti è stato applicato un impianto a base di Deslorelin Acetato da 4,7 mg nel sottocute tra le scapole.

La sperimentazione si proponeva di determinare l'efficacia del Deslorelin nel controllo della riproduzione del felino adulto tramite la valutazione dei dosaggi ormonali basali e post-stimolo che sono stati effettuati per un periodo variabile da 8 a 14 mesi con scadenza rispettivamente mensile e trimestrale.

I risultati evidenziano una efficace soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade in entrambi i sessi, con una significativa diminuzione della testosteronemia fino a livelli inferiori a 0,1 ng/ml e il mantenimento della concentrazione del progesterone al di sotto dei 2,0 ng/ml. I caratteri sessuali secondari del maschio regrediscono fino a scomparire; nella femmina c'è la completa soppressione dell'estro per tutto il periodo del monitoraggio. Inoltre si sono ottenute la diminuzione dell'aggressività e del roaming, nonché la scomparsa del comportamento di marcatura e dell'odore sgradevole dell'urina.

In un solo soggetto il trattamento non ha soppresso la produzione di testosterone né alterato i caratteri sessuali secondari o il comportamento.

1 INTRODUZIONE

Il controllo della riproduzione degli animali domestici è sicuramente uno degli aspetti di maggior attualità nella clinica dei piccoli animali. Il problema della sovrappopolazione e dell'aumento incontrollato delle nascite negli animali da compagnia si rivela essere sempre più una questione di rilievo poiché si connette ad altre problematiche quali il randagismo, i canili e le colonie feline in numero insufficiente rispetto ai potenziali ospiti e l'onerosa spesa che comportano (Zawistowski et al, 1998). Tra i vari sistemi il più utilizzato è sicuramente la sterilizzazione di tipo chirurgico: ovariectomia nella femmina e orchietomia nel maschio.

Nonostante siano tecniche sicure se correttamente eseguite, alterano irreversibilmente l'animale oltre ad essere comunque dei veri e propri interventi chirurgici, con tutti i rischi che un intervento può comportare. Oltre a questo è possibile che si presentino, seppur raramente, effetti collaterali quali la tendenza all'aumento di peso e, specie nel cane, l'incontinenza urinaria e l'alopecia (soprattutto parte posteriore dell'addome e faccia interna della coscia) (Scott, 1990). In particolare nel gatto l'obesità è un problema emergente, anche a causa dell'associazione con altre patologie quali diabete mellito, steatosi epatica e varie altre malattie dell'apparato urinario e tegumentario (Laflamme, 2006). La sterilizzazione è ritenuta uno dei maggiori fattori di rischio, in quanto l'aumento di peso inizia a breve distanza dalla chirurgia. Nei soggetti sterilizzati il metabolismo basale diminuisce di circa il 30%, per cui per mantenere stabile il peso la dieta dovrebbe diminuire proporzionalmente (Belsito et al, 2008); a ciò si aggiunga che l'intervento provoca già dopo 3 giorni un aumento dell'appetito (Kankuc et al, 2001).

In uno studio che ha preso in considerazione un gruppo di gatti maschi castrati chirurgicamente a 11 mesi di età, l'aumento di peso è stato preceduto da un aumento delle IGF-I (Insulin Growth Factor I) dopo una settimana, della prolattina dopo 7 settimane e della leptina (ormone che regola l'appetito) dopo 11 settimane. L'aumento di IGF-I può essere dovuto sia all'aumento di LH che si osserva dopo la gonadectomia che all'aumento di tessuto adiposo (dato che i recettori per l'IGF-I si riscontrano nel gatto anche negli adipociti). La prolattina stimola l'appetito e altera il metabolismo glucidico causando insulino-resistenza ed iperinsulinemia; la leptina è strettamente correlata all'appetito, all'aumento di tessuto adiposo ed allo sviluppo dell'insulino-resistenza (Martin et al, 2009) . Da molti proprietari la soluzione chirurgica non è

accettata, ritenendo una brutalità privare i propri animali della possibilità di riprodursi, esponendoli così al rischio di contrarre malattie e di sviluppare patologie legate alla sfera sessuale, nonché, nel caso della femmina, al rischio di gravidanza.

Un'alternativa all'intervento può essere la separazione fisica di maschi e femmine nel momento in cui le femmine sono recettive, ovvero in fase estrale, ma ciò comporta impegno da parte del proprietario e l'eventuale segregazione del soggetto in un box o in casa.

La terza possibilità prevede, sia nel maschio che nella femmina, la somministrazione di ormoni che permettano di bloccare l'attività dell'apparato riproduttore (Christiansen, 1987b).

Solitamente si preferisce intervenire sulla femmina in quanto quel che si vuole evitare è l'instaurarsi di una gravidanza indesiderata. Esiste la possibilità di effettuare l'ovariectomia (OVX), oppure l'ovarioisterectomia (OHE), la quale però viene in genere applicata solo se al momento dell'intervento la femmina è gravida e il proprietario non vuole che la gravidanza sia portata a termine, o nel caso di infezione all'utero. Ovviamente questa per sua natura previene efficacemente ogni ulteriore disordine uterino. Altra alternativa chirurgica è la salpingectomia (o legatura delle tube), che prevede la laparotomia con rimozione di una parte degli ovidotti dopo la legatura; in alternativa l'ovidotto può essere cauterizzato. Questo intervento impedisce l'instaurarsi di una gravidanza ma non altera il comportamento della femmina, per cui i sintomi dell'estro si manifesteranno con i normali intervalli (Wildt et al, 1985) e continuerà a persistere il rischio di malattie come la piometra o i tumori mammari tanto quanto in una femmina che non ha subito la chirurgia. Potrebbe però rivelarsi utile come sistema di sterilizzazione di massa, essendo semplice e rapida e non presentando particolari effetti collaterali.

L'OVX è comunque al momento l'intervento d'elezione, in quanto è efficace nel controllo della fertilità, causa scomparsa del comportamento estrale, previene patologie ovariche e, se praticata entro 1 anno d'età, conferisce protezione contro le neoplasie mammarie (Overley, 2005). In genere le complicazioni post-operatorie sono rare, e spesso si limitano all'aumento di peso. Per quanto riguarda l'OHE invece sono stati occasionalmente riportati episodi di fistole uretro-vaginali iatrogene con incontinenza, e fenomeni di aderenze. Se mal eseguito, l'intervento di sterilizzazione comporta la ricomparsa del ciclo estrale con tutte le manifestazioni ad esso connesse.

Negli Stati Uniti già da qualche tempo viene praticata la sterilizzazione precoce, cioè tra le 6 e le 14 settimane di età invece dei classici 6-9 mesi, al fine di tentare di arginare il problema della sovrappopolazione degli animali da compagnia (Olson et al, 2001). Sembra che questo approccio alla questione dia risultati positivi soprattutto per quanto riguarda l'incremento dell'adottabilità dei cuccioli che, essendo già sterilizzati, dal punto di vista dei potenziali proprietari sono più desiderabili. La castrazione così precoce causa però dei problemi non indifferenti, quali l'aumento della lunghezza delle ossa lunghe (a causa della chiusura fisiologica posticipata di 5-7 mesi) che porta ad avere animali più grandi e con possibili futuri problemi di artrite, artrosi e displasia (Houlton et al, 1992). Inoltre persiste la questione dell'obesità e soprattutto nella cagna (ma non nel gatto) aumenta il rischio di incontinenza urinaria. Ancora, nel gatto la sterilizzazione prepubere è associata a diminuzione dell'attività e aumento della timidezza verso gli estranei; in particolare nel gatto maschio c'è una riduzione dell'aggressività verso il veterinario, del comportamento sessuale e della marcatura con urina ed un aumento della tendenza a nascondersi (Stubbs et al, 1996). In definitiva quindi c'è la necessità di ulteriori studi sull'argomento.

Essendo la gatta ad ovulazione indotta, si può bloccare l'estro per un breve lasso di tempo con uno stimolo copulatorio artificiale che provochi un periodo di pseudogavidanza. Tale stimolo può essere applicato con un tampone sterile di cotone non lubrificato o si può procedere ad accoppiamento non fecondo con un gatto. Non è tuttavia consigliabile applicare questo sistema per molte volte di seguito, a causa dell'aumentato rischio di indurre piometra (Feldman et al, 2004).

La contraccezione chimica può essere attuata sia per il controllo dell'estro (prevenzione o soppressione) che per il controllo della riproduzione (prevenzione dell'impianto) (Kutzler et al, 2006). Da tempo sono disponibili sul mercato i progestinici, che possono essere utilizzati per bloccare l'insorgenza dell'estro in funzione della loro capacità di inibire l'asse ipotalamo-ipofisogonade con conseguente blocco della produzione di GnRH. E' possibile somministrarli in momenti diversi del ciclo in modo da ottenere la soppressione di un ciclo appena iniziato o il prolungamento temporaneo (giorni/settimane) o permanente (mesi) dell'anestro. Sono prodotti sicuri, dei quali si conoscono tutti gli effetti nel cane e nel gatto, sia quelli positivi che collaterali. Il Medrossiprogesterone Acetato a dosi di 2,0 mg/kg IM ogni 5 mesi può essere utilizzato sia per la posposizione temporanea o permanente del ciclo, che per la soppressione,

con un ritorno in calore molto variabile in funzione del soggetto da 1 mese a 2 anni. Il Megestrol Acetato invece è stato studiato per somministrazioni più brevi e non è adatto alla postposizione permanente, mentre è utile per quella temporanea e per la soppressione dell'estro. Il protocollo utilizzato cambia in funzione del momento del ciclo: in anestro il dosaggio è di 5 mg/gatta ogni 2 settimane, in proestro per la soppressione è di 5 mg/gatta/dì per 4 giorni e successivamente 5 mg ogni 2 settimane; la femmina dovrebbe comunque essere isolata dai maschi per i primi giorni di applicazione e ci si aspetta una rapida remissione dei segni di estro. Dato che questo principio attivo è metabolizzato a livello epatico, la sua somministrazione è sconsigliata in soggetti affetti da epatopatie. Il Proligestone è un progestinico di ultima generazione studiato per ottenere solo l'effetto inibitore sull'asse ipotalamo-ipofisi con effetto minore su utero, mammella e altri organi bersaglio del progesterone (Johnston et al, 2001).

Gli effetti collaterali tipici dei progestinici sono:

1. Aumentata incidenza di patologie uterine quali piometra, iperplasia cistica endometriale e mucometra, soprattutto se l'utero è stato esposto all'azione degli estrogeni.
2. Aumentata incidenza di patologie mammarie.
3. Aumentata secrezione dell'ormone della crescita GH (in seguito alla terapia con progestinici la ghiandola mammaria può diventare fonte alternativa della secrezione di GH).
4. Aumentato rischio di diabete mellito (in conseguenza dell'insulino-resistenza determinata dall'aumento di GH).
5. Mascolinizzazione dei feti femmina.
6. Soppressione adreno-corticale.
7. Ritardato inizio del parto.
8. Lesioni cutanee locali (decolorazione del pelo, alopecia) nel punto di inoculo del farmaco.
9. Alterazioni comportamentali (aumento di appetito e peso, polidipsia, lieve depressione del sensorio, calo della libido nel maschio).

Le complicanze sopradescritte si possono verificare a dosi molto elevate o per trattamenti troppo lunghi per quanto riguarda i punti 1-4 mentre a dosi normali per i successivi punti, soprattutto nel caso del punto 9.

E' consigliabile evitare il trattamento di femmine con anamnesi di cicli irregolari, di perdite vulvari al di fuori del calore o di endometrite. Accertarsi sempre che la femmina non sia gravida.

È possibile utilizzare anche il Mibolerone Acetato, un androgeno sintetico che provoca soppressione dell'estro a lungo termine alla dose di 50 µg/kg per OS una volta al dì, anche se è considerato controindicato nel gatto in quanto provoca epatotossicità e tireotossicosi (Shille et al, 1995). Inoltre questo principio attivo è associato ad ipertrofia clitoridea (aumento di volume 2-3 volte la norma), assottigliamento dello strato dermico della cervice e al comportamento di spruzzo di urina come nel maschio con lo stesso sgradevole odore.

Anche nel maschio la pratica di prima scelta è l'orchietomia, un intervento semplice, efficace ed irreversibile che elimina il lato sgradito della sessualità del gatto maschio. Infatti la castrazione causa un immediato decremento della concentrazione sierica di testosterone fino a livelli non rilevabili (<0,05 ng/ml). Oltre all'orchietomia, esiste un'altra possibilità di chirurgia, cioè la vasectomia. Tale intervento ha però spesso dato risultati poco soddisfacenti, per cui non è più utilizzato nella pratica comune. L'intervento di vasectomia in particolare comporta sì la sterilizzazione, ma il gatto può restare fertile per un certo periodo dopo l'operazione (sono stati infatti rinvenuti spermatozoi vivi e vitali per oltre 49 giorni dopo vasectomia prescrotale, e da 120 ore dopo elettrocoagulazione intra-addominale dei deferenti) ed inoltre continuerà ad accoppiarsi per abitudine con gatte in calore (pur determinando sterilità, la pratica non altera la libido e la capacità copulatoria); il comportamento sessuale quindi non viene alterato (Christiansen, 1987a). L'iniezione di agenti sclerosanti (clorexidina digluconato 4,5%, 0,1 ml) nella coda dell'epididimo determina azoospermia o oligospermia, ma non è una pratica in uso (Pineda et al, 1984). Anche nel maschio, seppur poco praticata, esiste la sterilizzazione chimica: ad esempio l'Alfacloridina è un principio attivo che comprometterebbe la motilità degli spermatozoi determinando sterilità (Shille, 1974). In alternativa è possibile utilizzare come nella femmina i progestinici per alterare il comportamento sessuale, ma ad una dose dieci volte maggiore (20 mg/kg) rispetto a quella usata nella cagna, con effetti negativi anche sul seme; a dosaggi inferiori non ci sono effetti né sul seme, né sulla libido (England et al, 1997).

La castrazione del gatto maschio sovente non è volta solo a eliminare la possibilità di riprodursi, ma soprattutto a sopprimere alcuni comportamenti spiacevoli tipici del gatto maschio quali la marcatura del territorio e l'odore sgradevole dell'urina, l'aggressività, le liti con altri maschi per la conquista della femmina ed il vagabondaggio. L'orchietomia si è dimostrata essere efficace anche sulla sfera comportamentale, determinando scomparsa del comportamento riproduttivo nell'arco di breve tempo. E' comunque bene ricordare che l'effetto della castrazione sul comportamento sessuale dipende dall'età e dall'esperienza sessuale precedente all'intervento: gatti sessualmente inesperti mostrano un comportamento di monta attenuato e la capacità di effettuare l'introduzione del pene è considerevolmente ridotta e persiste solo per un breve periodo dopo la chirurgia. Nell'adulto la sterilizzazione porta ad un calo del comportamento sessuale dopo un certo periodo di tempo e in alcuni gatti la capacità di penetrazione può persistere per anni.

La castrazione in età prepuberale in genere previene la marcatura del territorio, ma l'età alla quale viene effettuato l'intervento non ha influenza sull'evolversi del comportamento da adulto, né è correlata all'entità del diminuire di tale atteggiamento (Spain et al, 2004).

In merito ai cambiamenti comportamentali, in uno studio effettuato su un campione di 42 gatti adulti castrati in età adulta è stato ottenuto un'iniziale rapido declino dei combattimenti (88% dei soggetti), del vagabondaggio (94%) e della marcatura (84%), seguito da una graduale ulteriore diminuzione (Hart, 1973). Da sottolineare comunque che un gatto può iniziare a spruzzare urina anche in età adulta pur essendo sterilizzato a causa ad esempio di un cambiamento ambientale, come un cambio di abitazione o l'introduzione di un nuovo soggetto in casa o nel vicinato. Purtroppo nel maschio come nella femmina, la pratica di sterilizzazione non è priva di effetti indesiderati: in aggiunta alla predisposizione all'obesità (dato che diminuisce il fabbisogno calorico) e alla possibilità che si verifichino complicanze intra- o post-operatorie, nei gatti castrati prima dei sette mesi avviene l'adesione del prepuzio al pene ed una chiusura fisaria posticipata. Sembra inoltre che il diametro uretrale diminuisca nel maschio sterilizzato, predisponendo alla sindrome urinaria felina e alle patologie delle basse vie urinarie, anche se in questo ambito i risultati degli studi sono contrastanti.

Si può dire che fino a poco tempo fa non esisteva in commercio un farmaco veramente efficace e sicuro per la gestione riproduttiva (Trigg et al., 2006) nella pratica veterinaria felina, così come nelle altre specie. Un recente sviluppo ha portato però in commercio un nuovo e più potente

principio attivo: il Deslorelin, un agonista sintetico del peptide naturale GnRH, somministrato tramite un impianto sottocutaneo a rilascio controllato, con una durata di attività di 6 o 12 mesi in base alla formulazione utilizzata. Il meccanismo d'azione, la soppressione dell'asse della ghiandola pituitaria, è ben conosciuto ed è stato utilizzato con successo nella prevenzione dell'attività ciclica delle femmine di molte specie (Trigg et al, 2006). Il Deslorelin è classificato come un superagonista. Questo farmaco è stato inizialmente commercializzato in Australia, come impianto sottocutaneo per indurre l'ovulazione nelle cavalle. Successivamente è stato dimostrato che lo stesso principio attivo può sopprimere la fertilità anche nel cane, riducendo la produzione di testosterone ad un livello tale per cui in genere la produzione di sperma e la capacità di eiaculare scompaiono (queste le indicazioni della ditta). L'utilizzo del Deslorelin per la soppressione della riproduzione maschile e la sua commercializzazione come contraccettivo nel cane maschio sono eventi piuttosto recenti (Trigg et al., 2006).

Gli impedimenti maggiori dei principi attivi precedenti erano la mancanza di un loro facile utilizzo, la scarsa biocompatibilità, il non adeguato rilascio a lungo termine di un sufficiente quantitativo di farmaco ed il costo eccessivo. Il Deslorelin ha superato con successo la maggior parte di queste problematiche. Nessun effetto collaterale è stato infatti finora riportato. Gli studi su dosi ripetute confermano che il farmaco è sicuro e può essere usato per creare un periodo prolungato di soppressione della funzione gonadale. Questa innovativa tecnologia perciò potrebbe trovare ampia applicazione nelle varie specie di mammiferi di entrambi i sessi, almeno nelle sue potenzialità (Trigg et al, 2006). La tecnologia intanto sta guadagnando la regolare approvazione in molti paesi, come era già avvenuto in Australia (Dicembre 2004) e Nuova Zelanda (Settembre 2005). Nell'Aprile 2008 il prodotto è stato presentato in Europa per la prima volta ed è ora in commercio (Luglio 2008) anche in Germania, Francia, Olanda ed Italia.

1.1 Fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo

Ipotalamo

Per la produzione di testosterone è fondamentale il corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. La prima di queste strutture è una parte del diencefalo posta ventralmente al talamo, dove forma il pavimento del terzo ventricolo. L'ipotalamo comprende il chiasma ottico, il tuber cinereum, i corpi mamillari, l'eminenza mediana e l'infundibulo; può essere suddiviso in senso orale-aborale in una regione ipotalamica posteriore che comprende il

corpo mamillare, in una regione ipotalamica intermedia che comprende il tuber cinereum e l'ipofisi e in una regione ipotalamica rostrale che comprende il chiasma ottico e la regione preottica (Nickel et al, 1988). L'ipotalamo è connesso con fibre efferenti ed afferenti al sistema limbico ed indirettamente, mediante il fascio mammillo-talamico, con la corteccia. Arrivano ad esso anche afferenze sensitive, sia somatiche che viscerali, nonché afferenze degli organi di senso specifici, tramite i quali l'ipotalamo è informato sia delle condizioni ambientali, sia interne dell'organismo e viene quindi attivato per le opportune reazioni correttive. Infine, oltre che con la sostanza reticolare, prende connessioni con l'ipofisi, sia anteriore che posteriore; tali connessioni permettono all'ipotalamo di controllare, più o meno direttamente, quasi tutto il sistema endocrino e fanno da collegamento tra i due sistemi di coordinazione dell'organismo, quello nervoso e quello endocrino (Midrio,1996). L'ipotalamo quindi è coinvolto nel controllo della temperatura corporea e della circolazione sanguigna, nella regolazione dell'assunzione di cibo e liquidi, del ciclo sonno-veglia, del comportamento sessuale e dei meccanismi di difesa e attacco (FitzGerald, 2000).

Il controllo svolto dall'ipotalamo sull'ipofisi avviene attraverso due sistemi: il sistema neuroendocrino parvocellulare e il sistema neuroendocrino magnocellulare. Entrambi i sistemi prendono origine da cellule neuroendocrine che hanno la caratteristica di essere in grado di condurre sia impulsi nervosi, sia di liberare il loro secreto (peptidi) nel letto capillare. I neuroni parvocellulari (del nucleo preottico, ventromediale e arcuato) danno origine al fascio tubero infundibolare che si porta al letto capillare infundibolare dove vengono liberati i fattori di rilascio o inibizione. I fattori prodotti dall'ipotalamo sono: fattore di rilascio e inibizione per l'ormone della crescita, per la prolattina, per l'ormone gonadotropo, per l'ormone corticotropo e per l'ormone tireotropo. Questi fattori attraverso i vasi portali giungono all'adenoipofisi, dove stimolano le cellule endocrine che liberano gli ormoni che verranno drenati dal seno cavernoso ed entreranno infine in circolo. I neuroni magnocellulari sono invece posti nei nuclei sopraottico e paraventricolare e danno origine al fascio ipotalamo-ipofisario che si porta alla neuroipofisi. In questi nuclei vengono prodotti gli ormoni vasopressina e ossitocina, che sono contenuti in granuli secretori posti sulle terminazioni assonali e vengono liberati al bisogno nel letto capillare (che drena anch'esso il seno cavernoso).

Le cellule che secernono gli ormoni ipotalamici sono neuroni a tutti gli effetti e quindi ricevono afferenze sia di tipo eccitatorio che inibitorio. Inoltre sono sensibili anche alle concentrazioni di

neuropeptidi modulatori presenti nel liquido extracellulare e nel liquor e alla concentrazione degli ormoni circolanti e ipofisari, essendo poste fuori dalla barriera ematoencefalica. Esse risentono direttamente anche della concentrazione di metaboliti quali glucosio, corpi chetonici, acidi grassi, sodio (Na^+), calcio (Ca^+) che ne influenzano l'attività.

Una caratteristica comune a tutti questi neuroni è la regolazione a feed-back (solitamente di tipo negativo) esercitata dai prodotti della secrezione sull'attività delle cellule ipotalamiche. Si ha un feed-back a circuito lungo quando la secrezione ipotalamica viene inibita dall'ormone liberato all'ultimo passaggio della catena endocrina stimolata (ad esempio l'aumento di testosterone può inibire la produzione di GnRH). Si parla invece di circuito corto se l'azione è esercitata sull'ipofisi e di circuito cortissimo quando un ormone ipofisario influenza la secrezione del proprio fattore di rilascio (si può utilizzare ad esempio l'FSH per bloccare la produzione di GnRH).

Una caratteristica importante della secrezione di alcuni ormoni ipotalamici è la liberazione con modalità pulsatile. Tali ritmi sono influenzati da afferenze nervose connesse all'attività dei centri regolatori dei bioritmi (Aggugini et al, 1998a). L'importanza di sottolineare questo sistema di erogazione è dimostrata dal fatto che quando il GnRH viene somministrato in modo continuo con modalità farmacologica il sistema può essere sottoregolato. Nello specifico, ciò che a noi interessa è che il GnRH negli animali a riproduzione stagionale (quali il gatto) varia in relazione a ritmi annuali dipendenti dal fotoperiodo e la sua secrezione è pulsatile con frequenza ed ampiezza diverse in relazione alle variazioni della concentrazione plasmatica degli steroidi sessuali. La regolazione della secrezione dei neuroormoni e dei fattori di rilascio ipotalamici è il risultato dell'azione degli stimoli attivanti ed inibenti, a loro volta mediati dai diversi neurotrasmettitori e neuromodulatori.

Tra questi ultimi si ricordano: la dopamina (stimola la liberazione di GnRH e di GHRH), la noradrenalina (stimola il rilascio di GnRH), l'adrenalina (determina liberazione di GnRH), serotonina (inibisce l'asse GnRH-gonadotropina), peptidi prodotti dalle cellule denominate APUD (Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) del sistema Neuroendocrino Diffuso (Aggugini et al, 1998a).

Il GnRH è un decapeptide che viene secreto dal sistema parvocellulare dell'ipotalamo e più precisamente dal nucleo preottico mediale. Assieme alla dopamina che viene secreta nel nucleo arcuato, viene rilasciato a livello di eminenza mediana, nel sistema vasoportale. La sintesi di

GnRH richiede la formazione di un precursore più grande, con una regione C-terminale di 56 amminoacidi, chiamata "peptide associato al GnRH" o GAP. Questo precursore potrebbe provocare il rilascio di FSH o LH, ma in realtà è il GnRH il responsabile di tale evento.

L'effetto del GnRH si esplica attraverso l'attivazione di "secondi messaggeri", poiché non essendo liposolubile, non è in grado di oltrepassare le membrane cellulari. I secondi messaggeri derivanti dall'azione del GnRH sono l'AMP 3-5-ciclico, l'inositolo-trifosfato (IP3) e il diacilglicerolo (DAG).

Una volta legatosi al recettore della membrana cellulare, il complesso ormone-recettore attiva, a livello di membrana, un sistema di proteine enzimatiche ad azione GTP fosfatasi (proteine G) che sostituendo il guanidinotriphosphate (GTP) con guanodinodifosphate (GDP), libera la subunità $G\alpha$ -GTP che va ad attivare l'enzima adenilato ciclasi che, una volta attivato, utilizza l'ATP per formare AMP 3-5-ciclico, il quale funge da attivatore allosterico dell'enzima protein-chinasi A, che a sua volta agisce fosforilando enzimi substrato. L'AMP ciclico viene rapidamente inattivato da fosfodiesterasi che lo deciclizzano.

Nella cascata dell'inositolo-trifosfato (IP3) e del diacilglicerolo (DAG) il complesso ormone-recettore provoca l'attivazione di un enzima di membrana (Fosfolipasi C) che scinde inositolfosfatidi liberando inositol-trifosfato e diacilglicerolo. L'IP3 mobilizza il Ca^{2+} dai depositi intracellulari, il DAG attiva, in presenza di calcio, un proteina-chinasi C. Molto importante riveste in questo caso la concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, che può variare per la liberazione sia dai depositi intracellulari, sia per l'entrata di Ca^{2+} dall'esterno.

Sia l'AMP ciclico che l'IP3, il DAG e il Ca^{2+} intracellulare provocano l'attivazione di diverse protein-chinasi che a loro volta, mediante la fosforilazione, causano l'attivazione o l'inibizione di enzimi regolatori, responsabili degli effetti ormonali. L'AMP ciclico rispetto alla cascata dell'inositolo-trifosfato risulta però più efficace come secondo messaggero perché le reazioni che portano alla sua formazione sfruttano enzimi già esistenti, quindi si riducono i tempi di risposta alla stimolazione, e anche perché la sua azione è più intensa per la moltiplicazione a cascata delle successive reazioni enzimatiche (Aggugini et al, 1998a).

Ipofisi

L'ipofisi o ghiandola pituitaria è posta alla base del cranio, in una nicchia ossea chiamata sella turcica, circondata dalla dura madre. Essa è divisa strutturalmente e funzionalmente in tre

porzioni: l'adenipofisi, o pars distale, che secerne ormoni trofici e la neuroipofisi, che è in diretto collegamento con l'ipotalamo tramite l'infundibolo, e libera i prodotti dell'ipotalamo in circolo (vasopressina e ossitocina). La parte che si interpone tra le due è la pars intermedia. L'intera ghiandola è di origine ectodermica, ma l'adenipofisi è di derivazione endoectodermica (ha origine da un piccolo diverticolo della parte dorsale della faringe detta "tasca di Rathke"), mentre la neuroipofisi e la parte intermedia originano dal neuroectoderma (dal peduncolo infundibolare di derivazione diencefalica che si sviluppa ad imbuto verso il basso) (Cunningham, 2006).

La vascolarizzazione arteriosa dell'ipofisi ha origine dai rami ipofisari dell'arteria carotide che si divide in una serie di capillari nella parete dell'infundibolo. Questi capillari si immettono quindi nei vasi portali che attraversano l'adenipofisi, i quali si scompongono a formare un secondo letto capillare che bagna le cellule endocrine dove vengono riversati gli ormoni ipofisari (FitzGerald, 2000). Esiste anche un certo flusso ematico retrogrado dell'ipofisi all'ipotalamo, che provvede al meccanismo di feed-back degli ormoni ipofisari nei confronti del loro controllo neuroendocrino.

L'ipofisi costituisce un prolungamento anatomico funzionale del sistema nervoso centrale, rappresentando una centrale di smistamento degli impulsi neuroendocrini provenienti sia dal centro, attraverso l'ipotalamo, sia dalla periferia: la ghiandola risponde traducendo tali stimoli in segnali endocrini. La liberazione di ormoni ipofisari avviene in modo pulsatile, con modelli e ritmi diversi a seconda dell'ormone, della specie animale, dell'età, del sesso e di variazioni cicliche legate a ritmi endogeni di tipo ultradiano o circadiano (ACTH, GH, PRL) o connessi ad esempio con il ciclo riproduttivo (gonadotropine).

Le gonadotropine ipofisarie sono l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolo-stimolante (FSH), prodotte da cellule gonadotrope basofile, che costituiscono il 5-10% della popolazione cellulare dell'adenipofisi, e che sono dislocate soprattutto a livello di parte distale e della piccola pars puberali. Nelle specie animali esistono tre tipi di cellule gonadotrope che producono rispettivamente LH, FSH o entrambe. Le due gonadotropine, del peso circa di 30000 D, sono formate da due catene polipeptidiche, subunità α e β , di cui la α è identica per i due ormoni ed è comune a quella del TSH. Delle due catene la β è quella che conferisce specificità all'ormone e che quindi può permetterci di individuare la differenza di specie. Le gonadotropine

circolano nel sangue in forma libera e l'emivita è di 30-50 minuti per l'LH e 3-4 ore per l'FSH, ma la concentrazione ipofisaria dell'LH è circa 5-10 volte maggiore rispetto all'FSH.

Le gonadotropine sono essenziali per promuovere lo sviluppo delle gonadi, la steroidogenesi e la produzione dei gameti. La subunità β dell'ormone è responsabile dello specifico legame con il recettore di membrana delle cellule bersaglio, legame che attiva l'adenilato ciclasi e quindi la produzione di AMP ciclico e tutta la serie di reazioni che sono state descritte sopra. Nel maschio, l'LH stimola le cellule del Leydig a produrre testosterone il quale influisce a sua volta, mediante feed-back negativo, sulla produzione di LH, che quindi agisce sulla spermatogenesi in maniera indiretta, consentendo di mantenere a livello dei tubuli seminiferi un'alta concentrazione di testosterone necessario allo sviluppo degli spermatozoi. L'FSH invece è determinante per iniziare la spermatogenesi (in seguito mantenuta dal testosterone) ed agisce sulle cellule del Sertoli dove stimola l'enzima aromatasi, che permette la conversione del testosterone in estradiolo, e la produzione di proteine quali la transferrina, l'inibina ed una proteina che trasporta gli androgeni (Androgen Binding Protein=ABP) (Aggugini et al, 1998b).

Una delle maggiori differenze tra i sessi sta nel fatto che non esiste nel maschio la necessità di un feed-back positivo per la liberazione della gonadotropina, ma gli spermatozoi vengono prodotti e rilasciati in modo continuo all'interno di un sistema tubulare aperto verso l'esterno. Ciò annulla la necessità di un picco di rilascio di LH, che invece è necessario perché si abbia la rottura della superficie ovarica e il rilascio degli oociti nella femmina (Cunningham, 2006).

Testicoli

I testicoli nel gatto adulto hanno una dimensione di circa 15x10 mm e sono contenuti nel sacco scrotale, ventralmente all'ano, ben adesi al perineo (Aggugini et al, 1998c). Sono ricoperti da una sottile peluria e ricchi di ghiandole sebacee e sudoripare (Christiansen, 1987a). Il loro peso complessivo è di 2-4 grammi, anche se è stato dimostrato da uno studio compiuto sui gatti maschi in Nord America che tale peso può variare, con un aumento significativo in giugno rispetto a dicembre-gennaio (Kirkpatrick, 1985). Gli spermatozoi sono comunque presenti nei tubuli seminiferi per tutto l'arco dell'anno (Johnston et al, 2001).

I testicoli sono disposti con il polo craniale orientato in direzione cranio ventrale e con il polo caudale diretto caudodorsalmente, con il margine libero volto caudoventralmente e il margine epididimale volto in direzione cranio dorsale. Essi sono avvolti dal processo vaginale che, con

l'interposizione di un sottile strato sottodartico connettivale, è fuso con la tonaca dartos dello scroto. Tra le due tonache si insinua il muscolo cremastere, che nel gatto è poco sviluppato (Nickel et al, 1979). I testicoli sono racchiusi da una robusta capsula di connettivo denso e irregolare (albuginea), formata prevalentemente da fibre collagene e poche fibre elastiche, tra le quali sono presenti cellule muscolari lisce e, nel gatto, anche cellule interstiziali endocrine (Dellmann et al, 2000). La tonaca albuginea si continua mediante trabecole di tessuto connettivale, i cosiddetti setti testicolari, che convergono verso il mediastino del testicolo. I setti dividono il parenchima testicolare in vari lobuli, ciascuno dei quali contiene da uno a quattro tubuli seminiferi contorti. Gli spazi intertubulari sono occupati da tessuto lasso nel quale sono presenti vasi sanguigni e linfatici, fibrociti, cellule mononucleate e cellule interstiziali endocrine. In particolare le cellule interstiziali endocrine, le cellule del Leydig, producono androgeni e possono variare in volume e in numero durante l'anno. Esse si presentano disposte a cordoni e le singole cellule non sempre sono in stretto contatto con un capillare. Presentano una forma polimorfa e possiedono un nucleo sferoidale provvisto di scarsi granuli. I mitocondri delle cellule del Leydig sono coinvolti nella prima tappa della produzione ormonale steroidea, che consiste nella trasformazione del pregnenolone in testosterone, il quale può essere prodotto seguendo due diverse catene di reazione (Dellmann et al, 2000). La prima prevede la conversione del pregnenolone in idrossipregnenolone che viene trasformato in deidroepiandrosterone, quindi in andro5-ene-3beta,17beta-diolo e infine in testosterone. La seconda, partendo dal progesterone, passa per il 17 α -idrossiprogestosterone, convertito in androstenedione e quindi in testosterone. Dalla prima via si può passare in qualsiasi stadio alla seconda e arrivare al testosterone.

Le cellule del Leydig producono testosterone in risposta allo stimolo dell'LH. Le cellule interstiziali variano per forma e numero dal periodo neonatale (in cui sono presenti le cellule fetali testosterone-secernenti) a quello prepubere (nel quale non c'è attività androgenica) all'età adulta (Johnston et al, 2001).

I tubuli seminiferi contorti si presentano come anse tortuose, formate da un epitelio germinativo stratificato circondato da una lamina propria. L'epitelio è costituito da cellule di sostegno (cellule del Sertoli) e da cellule spermatiche. Le cellule del Sertoli, che derivano da cellule omonime indifferenziate della gonade prepubere, poggiano sulla membrana basale del tubulo ed hanno una forma allungata e a contorno irregolare che permette loro di insinuarsi,

attraverso processi laterali e apicali, tra gli spazi compresi tra le cellule germinali. Le cellule di sostegno adiacenti sono unite tra loro da giunzioni occludenti a formare una barriera di diffusione, detta barriera emato-testicolare, che evita agli spermatociti in maturazione e agli spermatozoi il contatto con il sistema immunitario oltre che con sostanze potenzialmente tossiche. Oltre alla funzione di protezione hanno soprattutto una funzione di nutrizione e di sostegno nei confronti delle cellule spermatogeniche, nonché di fagocitosi di cellule in via di degenerazione. Esse inoltre mediano l'azione dell'FSH e del testosterone sulle cellule germinali, liberano gli spermatozoi nel tubulo seminifero, producono la transferrina, proteina che lega gli androgeni, l'inibina, responsabile del feed-back negativo sulla produzione di FSH a livello ipofisario, e possono trasformare il testosterone in diidrotestosterone ed estrogeni (Dellmann et al, 2000).

Pene

Il pene è localizzato ventralmente allo scroto; è costituito da due corpi cavernosi, uno per ogni lato, e dal corpo spongioso che si trova nel mezzo. Nel soggetto prepubere il pene aderisce al prepuzio tramite la piega balano-prepuziale; la dissoluzione di questa struttura è androgeno dipendente, e nel gatto in particolare si verifica tra i 7 e i 12 mesi di età, comportando la capacità di sfoderare completamente l'organo. Se il gatto viene castrato precocemente, l'adesione tra pene e prepuzio persiste determinando fimosi (Feldman et al, 2004).

Nell'adulto intero il glande è una struttura conica lunga 5-10 mm che si dirige caudalmente ed è provvista di un numero variabile da 150 a 200 spicole peniene androgeno-dipendenti disposte ad anello, per un totale di sei - otto cerchi. Queste sono rivolte in senso opposto al pene e hanno la dimensione di 0,1 x 0,7 mm. Istologicamente, le spicole peniene del gatto sono composte da un core di tessuto connettivo ricoperto da epitelio cheratinizzato (sono molto



Immagine 1.1.1 : Particolare del pene di un gatto in cui sono ben evidenti le caratteristiche spicole peniene



Immagine 1.1.2 : Particolare del pene di un gatto maschio nel quale le spicole stanno regredendo.



Immagine 1.1.3: Particolare del pene di un gatto in cui le spicole sono completamente regredite.

simili alle papille della lingua felina). La superficie dei 4 mm apicali del glande è invece liscia, sia nel gatto prepubere che in quello adulto. In seguito alla castrazione del gatto sessualmente maturo, le spicole regrediscono rapidamente, in genere nell'arco di cinque o sei settimane (Johnston et al, 2001). Nei maschi sterilizzati queste strutture si ripresentano se vengono somministrati androgeni, e scompaiono nuovamente quando si interrompe la somministrazione (Aronson et al, 1967). Il ruolo fisiologico delle spicole nell'accoppiamento non è ben chiaro; sembra che comportino una maggiore stimolazione della parete vaginale della femmina durante il coito (favorendo la produzione di LH e la conseguente ovulazione) e siano utili a far sì che il pene non scivoli fuori (essendo dirette in senso opposto alla base del pene).

Testosterone

È il più importante ormone steroideo prodotto dalle cellule del Leydig, ed è infatti quello più abbondante, anche se negli organi bersaglio viene convertito in diidrotestosterone che è un ormone che ha maggior affinità di legame con i recettori intracellulari (Guyton, 1987).

Il testosterone viene secreto nel sangue dove è trasportato legato ad una α -globulina denominata Sex Hormone Binding Protein (SHBP), la cui sintesi epatica aumenta per azione degli estrogeni e degli ormoni tiroidei e diminuisce per azione degli androgeni. La concentrazione del testosterone nel sangue venoso testicolare è 40-50 volte più alta di quella che si trova nel circolo periferico e viene mantenuta elevata grazie ad una proteina legante gli androgeni (Androgen Binding Protein = ABP) che viene prodotta dalle cellule del Sertoli su stimolazione dell'FSH (Aggugini et al, 1998a). Una volta secreto, il testosterone circola nel sangue per circa 10-20 minuti prima di raggiungere i tessuti od essere degradato in prodotti inattivi ed escreto con le urine.

Il meccanismo d'azione del testosterone, come quello degli altri ormoni steroidei, prevede l'attraversamento della membrana plasmatica delle cellule bersaglio e quindi il legame con specifici recettori proteici nel citosol. Questo complesso ormone-recettore migra nel nucleo dove si lega a siti specifici di DNA. Ciascuno di questi complessi induce o reprime la trascrizione di un particolare insieme di geni che va da un numero di 50 a 100. Il testosterone agisce principalmente alterando l'espressione genica e non l'attività di un particolare enzima o trasportatore di membrana. L'effetto del testosterone non è immediatamente evidente, ma si palesa dopo qualche ora, poichè devono essere sintetizzati nuovi mRNA e nuove proteine

(Stryer, 2001). In molte cellule bersaglio la forma attiva del testosterone, quella che si lega ai recettori, è il diidrotestosterone (DHT): la conversione avviene nel citoplasma a cura di un enzima cellulare, la 5- α -reduttasi che idrogena il C in posizione 5. L'unica eccezione si ha in sede cerebrale, dove il testosterone non viene convertito in DHT ma in estradiolo da parte di un'aromatasi; solo così si può espletare la sua funzione (Aggugini et al, 1998a).

Nel gatto maschio la concentrazione sierica del testosterone varia da "non rilevabile" (valori inferiori a 0,5 ng/ml) a valori superiori ai 20 ng/ml (Johnstone et al, 1990). Sebbene la concentrazione a livello di vene testicolari sia diversa da quella riscontrata nelle vene periferiche (più elevata, varia da 23,2 a 36,8 ng/ml), esiste una forte correlazione tra le due ($P < 0,01$); quindi è possibile calcolare la secrezione dello steroide sessuale attraverso la determinazione dei livelli periferici di testosterone (Tsutsui et al, 1990). La secrezione di testosterone, come riferito da Johnstone e da Tsutsui, in questa specie avviene di tanto in tanto, non seguendo un ritmo diurno. Studi contraddittori riportano inoltre una presenza (Johnstone et al, 1984) o un'assenza (Kirkpatrick, 1985) dell'effetto della stagionalità sulla concentrazione di testosterone circolante. Sebbene per Howard un'anormale secrezione di testosterone sia un indicatore di una disfunzione testicolare nel gatto, il singolo dosaggio di tale ormone a livello di circolazione periferica è difficile da interpretare, per la episodica, pulsatile natura della sua secrezione e per la facilità con cui, in gatti normali, il risultato sia "non rilevabile" per valori $< 0,02$ ng/ml (Johnstone et al, 1984). Per questo motivo, effettuando diversi prelievi non si può essere mai certi di ottenere la concentrazione massima dell'ormone, ovvero il suo picco sierico. Pertanto è opportuno valutare il picco massimo di testosterone attraverso la somministrazione di fattori di rilascio come il GnRH (che stimola il rilascio endogeno di LH) o di sostanze a base di ormone luteinizzante come la gonadotropina corionica (hCG, che ha attività LH-simile) (Goodrowe et al, 1985).

Studi hanno dimostrato che la somministrazione IM di 250 UI di hCG aumentano la concentrazione basale di testosterone di 10 volte in 4 ore (raggiungimento di un plateau), mentre la somministrazione di 25 μ g IM di GnRH determina il picco sierico entro un'ora dalla somministrazione. Il plateau raggiunto con l'hCG perdura per diverse ore, al contrario il picco sierico di testosterone dopo somministrazione di GnRH è di breve durata, scendendo rapidamente nel giro di 4-5 ore verso valori basali (Johnstone et al, 1996). Il test di stimolo con hCG o con GnRH può essere utilizzato anche per fare diagnosi indicativa di testicolo ritenuto o

di orchietomia incompleta nel gatto (Memon et al, 1992), e può essere accompagnato dalla verifica clinica della presenza delle spicole peniene che, come già detto, sono androgeno-dipendenti; se rispettivamente un'ora e quattro ore dopo la somministrazione delle dosi sopra riportate di GnRH e hCG il valore sierico di testosterone supera 1 ng/ml allora il test è positivo. Lo stesso autore ha rilevato che la somministrazione endovenosa di hCG permette l'aumento della concentrazione basale di testosterone di cinque e di dieci volte dopo 30 minuti e 2 ore dall'iniezione, rispettivamente. La sterilizzazione causa una rapida diminuzione della concentrazione plasmatica del testosterone fino a livelli compresi tra 0 e 0,5 ng/ml, il che conferma che nel maschio intero la produzione e la concentrazione sierica di tale ormone è dipendente dal testicolo (Johnstone et al, 1984).

Azione del testosterone

In generale si può affermare che il testosterone è responsabile dei caratteri secondari che contraddistinguono l'organismo maschile (Guyton, 1987). Nel corso dello sviluppo fetale le gonadotropine corioniche, provenienti dalla placenta, stimolano la cresta genitale prima, e i testicoli poi, a produrre modiche quantità di testosterone. Successivamente non viene più prodotto testosterone fino alla pubertà, quando, sotto l'influenza degli ormoni gonadotropi dell'ipofisi anteriore, riprende e aumenta velocemente la sua produzione.

Al testosterone si deve il mantenimento prenatale del sistema dei dotti di Wolff e la loro differenziazione in deferenti ed epididimo; sotto il suo controllo avviene lo sviluppo della ghiandola prostatica e delle ghiandole accessorie. Il testosterone è responsabile dello sviluppo specifico dei caratteri sessuali maschili, quali il pene e lo scroto, a scapito del clitoride e della vagina (Guyton 1987). Sugli organi sessuali accessori (scroto, pene, prepuzio e uretra con le loro ghiandole, prostata, ampolla, dotto deferente, epididimo) la castrazione ha l'effetto di inibire il normale sviluppo se eseguita in età prepubere, e di condurre ad atrofia funzionale se più tardiva.

Nel gatto gli androgeni agiscono su molte caratteristiche sessuali secondarie. Per esempio il colore del mantello del maschio è generalmente più scuro e i peli nei maschi interi sono più spessi che nei maschi castrati. Anche le vocalizzazioni sono influenzate dal testosterone, così come la produzione di feromoni sessuali. Tra i caratteri secondari del gatto troviamo anche la presenza di papille cornee appuntite poste sul pene (Nickel et al, 1979), il cui sviluppo è

direttamente correlato al livello degli androgeni (Aggugini et al, 1998c). Esse compaiono a circa 12 settimane di vita e raggiungono il massimo sviluppo nell'adulto. Dopo la castrazione post-puberale regrediscono in 6 settimane secondo Aronson and Cooper (1967).

Il testosterone è indispensabile per il mantenimento della spermatogenesi agendo sulla divisione meiotica e sulla differenziazione morfologica degli spermatozoi, infatti permette la trasformazione degli spermatozoi primari in spermatozoi secondari. Anche il comportamento sessuale e la libido sono in buona misura testosterone-dipendenti, benché giochino un ruolo importante anche l'esperienza e i fattori ambientali: in gatti castrati da adulti è possibile che permangano a lungo certi comportamenti tipici del maschio intero quali la marcatura del territorio. Secondo uno studio condotto da Hart (1963) nel gatto maschio post-castrazione, la persistenza dello stimolo della caccia, dell'esplorazione e della marcatura del territorio non è da imputarsi alle pregresse esperienze bensì al vigore, e attribuisce questa differenza all'eredità e alla facilità di apprendimento. Secondo lo stesso autore i tre comportamenti non sono affatto correlati tra loro, una diminuzione di uno non comporta necessariamente la diminuzione dell'altro, quindi può esserci un gatto che caccia e spruzza ma non esplora. Non c'è nemmeno una relazione tra età di castrazione e la velocità di scomparsa di tali comportamenti. Quello che invece è certo è che l'orchietomia provoca la scomparsa dell'odore sgradevole caratteristico dell'urina del gatto maschio intero.

Il testosterone ha un ruolo decisivo nella differenziazione del comportamento sessuale durante l'ontogenesi. Esiste infatti un periodo, che può essere al termine della vita perinatale o nei primi giorni dopo il parto, in cui il cervello ancora sessualmente indifferenziato del feto viene condizionato in senso maschile dal testosterone, la cui concentrazione sale bruscamente e rimane elevata per breve tempo. In questo caso specifico l'androgeno agisce sui centri nervosi dell'ipotalamo dopo essere stato aromatizzato ad estrogeno. Inoltre gli steroidi sessuali maschili hanno azione anche sullo sviluppo corporeo, è per questa ragione che, spesso, i soggetti maschi hanno dimensioni superiori a quelle delle femmine.

La castrazione, abbassando la concentrazione di testosterone nel sangue, può provocare l'aumento di peso e anche obesità. Uno studio condotto da Fettman et al (1997) ha osservato la variazione di peso in 6 gatti maschi (18-24 mesi di età) e sei femmine dopo castrazione. Questi soggetti sono stati alimentati ad libitum per un mese, con dieta di mantenimento, e sono stati confrontati con un gruppo di controllo di 6 femmine e 5 maschi interi. I maschi

orchiettomizzati dopo un mese hanno aumentato significativamente ($P < 0,05$) il loro peso e la percentuale di grasso corporeo (aumento dei trigliceridi ma non del colesterolo) sia all'interno di tutti i gruppi di età sia rispetto ai soggetti non castrati. Allo stesso modo si è notato un aumento dell'assunzione di cibo ($P < 0,05$) nei soggetti castrati. Gli androgeni agiscono sull'ossificazione delle epifisi ossee, favoriscono la crescita e la robustezza delle ossa nonché lo sviluppo delle masse muscolari, poiché esaltano, in generale, il metabolismo proteico.

1.2 Comportamento aggressivo e territorialità

Lo studio dell'aggressività è uno dei problemi comportamentali di più difficile valutazione poiché si presta a interpretazioni e generalizzazioni che si allontanano spesso dall'analisi scientifica. In realtà la variabilità degli atteggiamenti aggressivi non consente di dare una chiara definizione di aggressività, anche se questa in generale può definirsi come qualsiasi tendenza volta ad infliggere un danno ad un altro individuo. Molti etologi oggi distinguono l'aggressività, rivolta ad animali della stessa specie, dall'aggressione, che comprende reazioni di difesa verso i predatori o specie concorrenti. Tale distinzione non è di tipo accademico, visto che sperimentalmente si è notato che stimolando elettricamente la porzione mediana e ventrale dell'ipotalamo nel gatto, si ottiene un'aggressività interspecifica, mentre se si stimola l'ipotalamo laterale si ottiene un aumento della fame e l'attivazione del meccanismo predatorio. Per Eibl-Eibesfeldt (citato da Aggugini et al, 1998) l'aggressività interspecifica ha un forte componente innata e gli animali che per qualsiasi ragione o per un periodo piuttosto lungo non possono combattere, accumulano una carica energetica tale che sono portati a cercare situazioni che permettano loro di scaricare l'impulso aggressivo.

I processi fisiologici encefalici che stanno alla base di tali accumuli emozionali non sono ancora sufficientemente chiariti, mentre è noto che alte concentrazioni di ormoni androgeni in circolo, così come alti livelli di catecolamine nel sistema nervoso centrale, predispongono all'aggressività. Secondo alcuni ricercatori una delle cause più importanti del comportamento aggressivo sarebbe la "frustrazione", ovvero la delusione derivata dalla mancata attuazione di uno schema comportamentale a causa di un impedimento esterno o la mancata realizzazione di un avvenimento atteso o voluto. In realtà pare difficile che ogni atteggiamento possa scaturire da frustrazione. Negli animali domestici esistono diverse situazioni che possono scatenare comportamenti aggressivi e secondo una classificazione fatta da Mayer, tali comportamenti

possono essere divisi in sette classi (Aggugini et al, 1998e). Tra queste citiamo quelle che sono più influenzate dagli androgeni: l'aggressività sociale, che si verifica soprattutto in gatti che vivono in colonie o in gruppo dove c'è la necessità di stabilire le posizioni di dominanza/sottomissione; l'aggressività territoriale, che consiste nella difesa del proprio territorio; l'aggressività sessuale, caratterizzata da lotte tra gatti maschi per la conquista del partner sessuale. Non è invece dipendente dagli androgeni l'aggressività predatoria (Simpson, 2001).

Uno degli atteggiamenti che più preoccupano i proprietari dei gatti è proprio legato all'aggressività sia territoriale (anche se il territorio difeso dai gatti copre solo una piccola parte del territorio in cui vivono) che sessuale dei gatti maschi adulti, poiché, oltre a procurare ferite di una certa gravità all'animale, può favorire la trasmissione di patologie debilitanti quali la Feline Immunodeficiency Virus (FIV) e la Feline Leukemia Virus (FeLV).

Il testosterone, come sopra ricordato, agisce a livello encefalico come estradiolo, quindi esso aumenta l'aggressività in dipendenza della concentrazione dell'aromatasi e dei recettori per gli estrogeni. Infatti, provando a bloccare l'enzima con degli inibitori, si è scoperta una correlazione tra l'intensità del comportamento aggressivo e l'attività dell'aromatasi ($P < 0,02$) nell'ipotalamo posteriore. L'attività del testosterone nell'adulto si esplica sia attraverso un'azione diretta a livello di nucleo cellulare, sia attraverso una modificazione della permeabilità della membrana cellulare dei nervi. Questo suggerisce l'esistenza di recettori di membrana per steroidi in aggiunta ai recettori nucleari. L'azione a livello di membrana prevede un cambiamento del potenziale elettrico, probabilmente attraverso l'attivazione dell'AMP-c, che provoca il rilascio di neurotrasmettitori nella sinapsi, che regolano l'entrata degli ioni calcio nelle membrane cellulari. Quando un ormone steroideo altera l'attività elettrica di un neurone bersaglio lungo uno degli assoni, viene modificata anche la quantità di neurotrasmettitore rilasciato dal neurone stesso. Recettori steroidei sono distribuiti in aree ben precise del sistema nervoso centrale, ed è noto che interferiscono con la liberazione di noradrenalina, dopamina e serotonina nel ratto. Il testosterone agisce infatti sui recettori 5-HT per la serotonina che, se viene a trovarsi in bassa concentrazione, porta ad un incremento dell'aggressività. Inoltre l'aumento della concentrazione di testosterone diminuisce la densità dei recettori inibitori GABA_A (presenti in diverse regioni del cervello) i quali a loro volta, se presenti in basse quantità, contribuiscono anch'essi all'aggressività. Per concludere il

testosterone sopprime il turnover della dopamina nell'ipotalamo anteriore nei ratti maschi; questo provoca un aumento di tale neurotrasmettitore che è correlato positivamente con l'aggressività verso altri maschi e l'istinto predatorio, mentre se si stimola l'ipotalamo anteriore si ottiene un'aggressività indotta da paura o da eccitazione (Simpson, 2001).

Altri spiacevoli inconvenienti per i proprietari, legati alla territorialità, sono: l'eliminazione inappropriata di urina e la spruzzata di urina che questa specie, come molte altre, utilizza per lasciare il proprio odore (Aggugini et al, 1998f). Alla base di questi due ultimi comportamenti possono esserci dei fattori predisponenti quali: malattie (calcoli renali, blocco renale e cistite, FIV e FeLV), ormoni (i gatti castrati spruzzano molto meno dei gatti interi), stimoli ambientali (la vista, il suono e/o l'odore di altri gatti interi dentro casa o fuori casa), problemi legati allo stress (ansia da separazione, introduzione di un bambino in casa o di un altro gatto nell'ambiente domestico o in una colonia). La marcatura del territorio risulta molto più comune in ricoveri molto affollati, e in ambienti con più di 10 gatti l'incidenza di tale fenomeno è $\geq 10\%$. I gatti che vivono con una femmina sono più portati a spruzzare rispetto ai soggetti che vivono con altri gatti maschi (Seksal, 2000).

Per risolvere queste spiacevoli (per i proprietari) abitudini, ci sono attualmente diverse soluzioni, più o meno valide. In uno studio condotto in California su 40 gatti castrati e 7 femmine sterilizzate si è ottenuta una riduzione della frequenza di marcatura del territorio in un periodo di due settimane semplicemente pulendo l'urina subito dopo la spruzzata, togliendo i rifiuti dalla cassetta della lettiera giornalmente, cambiando la lettiera e pulendo la cassetta della lettiera settimanalmente (Pryor, 2001). Altre variazioni quali diminuire il numero di gatti che vivono in uno stesso ambiente, impedire al gatto l'accesso a finestre e porta (diminuisce l'esposizione a stimoli sonori, visivi e olfattivi), e tenere più tempo l'animale in casa, possono diminuire l'ansietà del gatto. Purtroppo la marcatura del territorio è un comportamento innato, quindi la sola modificazione comportamentale e/o ambientale non è efficace, bisogna inevitabilmente utilizzare dei farmaci.

La maggior parte dei farmaci usati per questo scopo non sono registrati per gli animali e spesso hanno effetti collaterali spiacevoli (insufficienza renale o epatica, aritmie, ritenzione urinaria, disturbi gastrointestinali ecc.). Tali trattamenti farmacologici causano diminuzione del livello di ansietà e, se associate ad una modificazione ambientale e comportamentale, riducono la frequenza delle spruzzate. Tra le specialità troviamo: diazepam in dose 0,2-0,4 ng/Kg per os una

o due volte al giorno (il 57% dei gatti maschi risponde alla terapia); l' amitriptilina (antidepressivo triciclico che però è di difficile somministrazione); la fluoxetina, la fluvoxamina, la paroxetina (sono tutte e tre inibitori selettivi del re-uptake della serotonina); il buspirone; il megestrolo acetato alla dose di 2,5-5 mg per os una volta al giorno per 30 giorni massimo (40-80% di efficacia nei maschi); il medrossiprogesterone acetato (20 mg/kg sc, massimo 3 iniezioni in un anno) (Seksell, 2000). Una tecnica recente utilizza un analogo della frazione F3 del ferormone facciale felino associato con un estratto alcolico della Valeriana *Officinalis*. Questo prodotto (Feliway®Ceva) spruzzato per trenta giorni in vari punti del territorio dove il gatto marca di solito riduce lo stato di ansietà del gatto e quindi l'innato stimolo a spruzzare (Seksell, 2000). Questo metodo consente di trattare più gatti che vivono nello stesso ambiente contemporaneamente e non presenta, contrariamente ai farmaci sopracitati, effetti collaterali.

Esistono infine alcuni trattamenti chirurgici quali la miectomia bilaterale dell'ischicavernoso (il gatto non riesce più ad estendere il pene per direzionare l'urina su superfici verticali), la tractotomia olfattoria (produce anosmia, il gatto non avverte più gli odori che sono una delle cause che predispongono alla spruzzata) e infine la castrazione (87% di efficacia). Mentre sui primi due esistono fortissime riserve relative al benessere animale (ed infatti non sono comunemente usati) la castrazione è ormai tecnica accettata da tutti ed approvata anche dalle associazioni "animaliste" in molti paesi del mondo.

La castrazione è stata associata con l'aumento del peso e l'obesità nel gatto. In uno studio condotto da Fettman et al (1997) su gatti maschi e femmine tra i 18 e 24 mesi ed alimentati ad libitum con dieta di mantenimento, ha dimostrato che dopo sterilizzazione: i maschi orchiettomizzati incrementano il loro peso più dei gatti interi già dopo 1-3 mesi post castrazione, le femmine ovariisterectomizzate aumentano di peso più dei maschi sterilizzati dopo 1-3 mesi post intervento, e la loro percentuale di grasso corporeo aumenta più che nei maschi sterilizzati.

Gli animali castrati aumentano la quota di cibo ingerito giornalmente dopo il terzo mese (Fettman ed al. 1997). Proprio l'aumento della quantità di cibo ingerito sembra essere la causa maggiore di aumento di peso nei gatti castrati, quantunque non si possa dimenticare che la diminuzione dell'attività fisica legata alla sterilizzazione sia un fattore importante che concorre all'incremento ponderale. Queste osservazioni vengono confermate da un ulteriore studio condotto da Nguyen et (2004) che in aggiunta dimostra come anche la composizione della dieta

influisca sull'aumento di peso. Dodici gatti maschi e dodici femmine non ancora maturi, dopo la castrazione, sono stati alimentati alcuni con dieta ricca di lipidi e altri con dieta povera di grassi e confrontati con gatti interi di entrambi i sessi ai quali è stata somministrata in parte una dieta "grassa" ed in parte una dieta "magra". I risultati hanno confermato un aumento di peso per tutti i gatti, ma maggiore per i gatti castrati rispetto agli interi e per i soggetti alimentati con dieta ricca di grassi. La "massa grassa" corporea è aumentata maggiormente nei soggetti sterilizzati rispetto a quelli interi ed in quelli alimentati con dieta ad alto contenuto di grassi rispetto a quelli alimentati con dieta a basso contenuto di lipidi (Nguyen et al, 2004).

1.3 Fisiologia dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaia

In buona parte il meccanismo di secrezione gonadotropica ricalca quello del maschio, ma mentre in quest'ultimo la produzione di testosterone non necessita di un feed-back positivo per la liberazione dell'ormone, nella gatta è necessario un picco di rilascio di gonadotropine perché si abbia la rottura della superficie ovarica e il rilascio degli ovociti. La stimolazione della vagina da parte delle spicole peniene del maschio è seguita immediatamente da un aumento dell'attività neurale nelle aree ipotalamiche contenenti il GnRH. Si pensa che il successivo massivo rilascio di questo ormone determini il picco di LH che normalmente segue il coito. È stato dimostrato che il picco di LH insorge dopo 15 minuti dall'accoppiamento (Concannon et al, 1980). Sembra che i livelli di LH siano correlati al numero di accoppiamenti: più coiti producono livelli di tale ormone più elevati e prolungati, ma se gli accoppiamenti si protraggono troppo a lungo la stimolazione inizia ad essere inefficace. Il valore massimo è raggiunto dopo circa 4 ore dal momento in cui sono avvenuti da 8 a 12 coiti; si ritorna alla concentrazione plasmatica basale dopo 24 ore. Da notare che i picchi di LH sono significativamente inferiori se alla gatta viene permesso di accoppiarsi solo 4 volte nell'arco di 4 ore, ed ancora minori se può farlo un'unica volta.

Ogni accoppiamento comunque esita in un rilascio di LH che può essere sufficiente o meno a causare l'ovulazione, che avviene approssimativamente 24 ore dopo il picco di LH. Alcune femmine non producono concentrazioni di LH tali da indurre ovulazione, nonostante i ripetuti accoppiamenti con maschi di provata fertilità; altre volte accade che anche secrezioni adeguate di LH non conducano all'ovulazione. In effetti sembra che sia necessaria una sorta di maturità intrinseca del follicolo perché lo stimolo dell'LH possa essere efficace: ciò spiegherebbe l'apparente variabilità nel successo degli accoppiamenti (potrebbe essere che alcune femmine

siano recettive sessualmente prima che il follicolo abbia raggiunto uno stato di sufficiente maturità per rispondere allo stimolo dell'LH). Quindi la variabilità sopra citata potrebbe essere il risultato della relazione tra recettività sessuale e maturità follicolare.

Ovulazione indotta in assenza di accoppiamento

Occasionalmente può accadere che si verifichi ovulazione senza che avvenga il coito: premere sulla zona perineale o alla base della coda sembra essere in alcuni soggetti comunque uno stimolo sufficiente a indurre l'ovulazione (Lofstedt, 1982). Il picco di LH può accompagnare la monta anche quando questa avviene senza intromissione (Concannon et al, 1980). E' possibile indurre il rilascio di LH e la conseguente ovulazione anche tramite stimolazione artificiale di vagina e/o cervice: ad esempio questa eventualità si può verificare mentre si esegue il prelievo per la citologia vaginale usando il classico tamponcino in cotone. Se si desiderasse provocare meccanicamente l'ovulazione con questo sistema, il clinico dovrebbe introdurre il tampone in vagina almeno da 4 a 8 volte ad intervalli di 5-20 minuti; ogni inserimento deve durare solo 2-5 secondi. Come per la stimolazione naturale comunque, le stimolazioni ripetute non portano all'ovulazione tutte le gatte; in alcune è necessario ripetere il procedimento più volte al giorno per alcuni giorni consecutivi. Un altro sistema utile a far sì che il soggetto ovuli è quello di aumentare artificialmente il fotoperiodo: infatti un periodo di 24 ore di luce e zero di buio porta ad una durata dell'estro maggiore, aumenta la follicolo genesi e il peso delle ovaie, ma non è efficace nell'induzione dell'estro quanto un rapporto 14 ore di luce: 10 ore di buio (Feldman et al, 2004).

L'ovulazione può eventualmente essere indotta o facilitata anche utilizzando gonadotropine corioniche umane (hCG) alla dose di 250 UI per via intramuscolare al giorno 1 e 2 dell'estro (Lein et al, 1983) oppure somministrando una sola volta il GnRH via IM al dosaggio di 25 µg, il che provoca un aumento dell'LH nel siero e l'ovulazione nelle gatte in estro.

Ovaie

Le ovaie nella gatta adulta sono delle strutture ovali, approssimativamente della dimensione di 1,0 x 0,3 x 0,5 cm per un peso di 220 mg, localizzate sotto la 3^a-4^a vertebra lombare e caudalmente al rene (Johnstone et al, 2001); sono parzialmente coperte dalla borsa ovarica (Christiansen, 1987c). Ogni ovaia è adesa al diaframma tramite il legamento sospensorio, alla parete dorsale dell'addome con il mesovario e all'estremità del corno uterino grazie al sottile e

breve legamento proprio dell'ovaio. La borsa ovarica ha una piccola apertura a forma di fessura sul versante mediano che permette la comunicazione con la cavità peritoneale. L'aspetto macroscopico e quello istologico dell'ovaio variano in funzione della fase del ciclo estrale. Durante l'anestro la superficie ovarica è liscia e sono visibili follicoli di 0,5 mm di diametro. Con l'inizio della fase estrale, da tre a sette continuano la loro crescita, mentre gli altri vanno in atresia. Buona parte dello sviluppo follicolare avviene nelle 48 ore precedenti la comparsa del comportamento tipico del calore; una volta maturi, i follicoli misurano da 2,5 a 3,5 mm di diametro. Il coito, la stimolazione vaginale o la somministrazione di gonadotropine inducono l'ovulazione all'incirca dopo 24-32 ore. I corpi lutei, strutture che si formano una volta che si è avuta la rottura follicolare, macroscopicamente sono di colore giallo-arancio e possono raggiungere il diametro di 4,5 mm, con un picco di dimensione 16 giorni dopo l'ovulazione; persistono per 6-8 mesi.

Nella gatta anziana le ovaie possono presentare noduli ed essere diminuite di volume, ma sono comunque presenti follicoli e corpi lutei, come se non risentissero di atrofia senile (Feldman et al, 2004).

Vagina, vestibolo e vulva

La vagina nella gatta adulta si estende dalla cervice all'imene, appena anteriormente all'orifizio uretrale (Johnston et al, 2001). E' caratterizzata da pieghe longitudinali che si modificano durante le varie fasi del ciclo. Nelle femmine prepuberi o in anestro l'epitelio vaginale è di tipo cubico con uno strato superficiale di cellule piatte; durante il proestro, diviene squamoso stratificato (15-20 strati) e alla fine dell'estro diminuisce gradualmente di altezza (3 strati di cellule). Successivamente si trasforma in epitelio colonnare, ed è possibile osservare occasionali granulociti.

Per vestibolo si intende la porzione di apparato genitale che va dall'orifizio uretrale esterno alla vulva, lunga circa 2 cm; il suo decorso è orizzontale. L'ampiezza della parte permette di accogliere una sonda di 4 mm di diametro introdotta per circa 20mm: questo dato suggerisce che il pene eretto del maschio, che ha un diametro di 5 mm, non può penetrare nella porzione craniale della vagina (che peraltro è di solo 1 mm di diametro, e considerando che la giunzione vestibolo-vaginale è stretta ed anelastica).

Infine la vulva, costituita da due piccole labbra vulvari laterali che si uniscono dorsalmente e ventralmente a formare due commessure, è localizzata poco sotto l'ano. Le suddette strutture nella gatta rispondono in maniera relativa agli estrogeni, e rimangono piccole e coperte di pelo, pur diventando più rosse, anche durante proestro ed estro, a differenza della cagna nella quale si ha un notevole aumento di volume. Inoltre le labbra vulvari sono più piccole nelle femmine sterilizzate rispetto a quelle intere.

1.4 Fisiologia della riproduzione nella gatta

Stagione riproduttiva e pubertà

L'età della pubertà, cioè quando la gatta ha il primo estro, è assai variabile e dipende sia dalla razza che dal periodo dell'anno. La maggior parte delle gattine ha il primo estro quando raggiunge il peso di 2.3-2.5 kg (cioè circa l'80% del peso vivo da adulta), e ciò avviene intorno al 7° mese, anche se in alcuni casi la maturità può essere raggiunta già al 5° mese; le razze pure a pelo lungo come i persiani invece possono arrivare alla maturità al 12°-18° mese (Shille et al, 1995). Nella gatta europea normalmente la pubertà è raggiunta tra il 5° e il 12° mese, con frequenza maggiore tra 6 e 9 mesi, se il fotoperiodo è favorevole (Johnston et al, 2001). È frequente che il primo calore avvenga nel primo autunno-inverno dopo i quattro mesi di età. L'avvento della pubertà è influenzato più dal momento della nascita in relazione alla stagione riproduttiva che dall'età anagrafica. Infatti, le femmine nate tra ottobre e dicembre possono non essere sessualmente mature quando pochi mesi più tardi inizia la stagione riproduttiva, ma possono avere il primo estro nella stagione seguente, cioè all'età di 12-16 mesi (Jemmet et al, 1977). Il fatto di poter vagabondare in un territorio relativamente ampio (cioè le gatte che vivono in "free-roaming") permette alla femmina di raggiungere la maturità prima rispetto ad una gatta tenuta costantemente in casa (Christiansen, 1987c).

Il periodo dell'anno e la durata della stagione riproduttiva dipendono dalla posizione geografica: nelle zone climatiche temperate come l'Italia l'attività riproduttiva è sospesa durante l'autunno-inverno (infatti in ottobre si osserva la maggior percentuale di gatte in anestro), per riprendere poi a ciclare a metà inverno. Durante l'anestro i livelli di melatonina sono molto elevati, mentre da gennaio in poi il calo della melatonina si accompagna ad un graduale aumento della prolattina (Aggugini et al, 1998e).

I primi calori insorgono da pochi giorni a qualche settimana dopo il solstizio d'inverno e si susseguono in maniera regolare fino a marzo-aprile. In seguito la frequenza dei calori nell'ambito della popolazione felina tende progressivamente a diminuire, fino ad arrestarsi completamente nella maggior parte delle femmine entro settembre-ottobre. Se la gatta è tenuta costantemente in casa o comunque esposta alla luce artificiale per 10 ore giornaliere risulta recettiva per tutto l'arco dell'anno, anche se in realtà questa evenienza è più comune nel gatto europeo a pelo corto che non nelle razze orientali. La durata della luce diurna è un fattore di grande impatto nel controllo della riproduzione: infatti durante l'anno il numero dei parti dei gatti tenuti a luce diurna naturale differisce da quello dei gatti tenuti in condizioni di laboratorio, ed è noto che un periodo di luce superiore alle 12-14 ore giornaliere favorisce la riproduzione, facendo sì che l'ipotalamo produca GnRH e di conseguenza vengano immessi in circolo in modo pulsatile LH e FSH. Livelli inadeguati di luce per intensità o durata sono i maggiori responsabili di anestro prolungato in gatte tenute in casa o in allevamento (Feldman et al, 2004). C'è invece una componente soggettiva per quanto riguarda l'influenza della temperatura esterna elevata e dell'umidità ambientale: sembra che la durata dell'interestro aumenti con l'aumentare della temperatura (Concannon et al, 1983).

Ciclo riproduttivo

La gatta è un animale poliestrato stagionale ad ovulazione indotta, cioè l'ovulazione e la formazione del corpo luteo avvengono solo se c'è stato l'accoppiamento; questo in linea teorica perché è dimostrato che può verificarsi anche ovulazione spontanea in un 30% dei soggetti (Gudermuth et al, 1997). La durata e l'evoluzione del ciclo dipendono dall'eventuale accoppiamento, dalla conseguente ovulazione e dal possibile concepimento, e se eventuale gravidanza è seguita da allattamento.

Un ciclo anovulatorio ha una durata di circa 2-3 settimane, ma possono verificarsi cicli di lunghezza differente o estro prolungato. Gli intervalli tra cicli estrali sono prolungati, mediamente sei settimane (intervallo 30-75 giorni) in gatte che ovulano dopo accoppiamento ma non restano gravide (Feldman et al, 2004).

Il ciclo estrale è suddivisibile nelle quattro fasi di seguito riportate:

- Proestro: generalmente definito come il periodo nel quale i maschi sono attirati da femmine non recettive. Dura da poche ore a due giorni; tale fase spesso non viene

rilevata a causa della sua brevità; infatti spesso si passa da anestro o interestro ad una fase di estro conclamato (Johnston et al, 2001). Generalmente il proestro è caratterizzato da aumentato desiderio di avere carezze, aumentata frequenza di minzione e spargimento di urina come nei gatti maschi. L'edema della vulva può essere presente o poco pronunciato e non ci sono perdite emorragiche come nella cagna (Christiansen, 1987c). La gatta non accetta ancora la monta, e i suoi livelli di estradiolo (E_2) sono relativamente bassi (≤ 20 pg/ml). Durante questo periodo avviene un rapido sviluppo selettivo di 3-7 follicoli ovarici (che passano da 1 mm delle prime ore di proestro a 1,5 mm di diametro all'inizio dell'estro), a scapito degli altri che vanno in atresia.

- Estro: questa fase si riconosce spesso osservando la risposta comportamentale di una femmina alle attenzioni di un gatto maschio: solo e soltanto in questo momento la femmina accetta la monta. Si considera l'inizio dell'estro il momento in cui la gatta permette al maschio l'accoppiamento e il termine quando cessa l'accondiscendenza. Spesso il passaggio da proestro a estro è molto brusco dal punto di vista comportamentale, e spesso si verifica in 12-24 ore. La durata dell'estro è molto influenzata dalla stagione; in primavera il numero di giorni di estro aumenta (5-14 giorni ciclo), mentre nelle altre stagioni cala (1-6 giorni ciclo). Nelle gatte che ovulano il periodo estrale dura in media 7,5 giorni, con un range che varia da 3 a 16 giorni; il coito, che induca o meno ovulazione, non modifica la durata della fase follicolare: nelle gatte in cui l'accoppiamento porta a ovulazione la suddetta fase si protrae per 7,2 giorni, mentre in quelle in cui non si ha ovulazione la durata è di 7 giorni. I segni estrali però terminano 24-48 ore post-coito (Root, 1995).

Durante l'estro la gatta modifica il suo comportamento: si struscia più frequentemente contro mobili/persone, miagola emettendo richiami per il maschio, mostra lordosi, devia la coda di lato ed è disposta all'accoppiamento. Ci possono essere contrazioni spasmodiche della regione perineale, specialmente se la regione pelvica dorsale viene accarezzata. Altri segni comuni dell'estro sono l'anoressia e gli spruzzi di urina (Wildt, 1981). Il comportamento estrale è associato alla produzione e secrezione di estrogeni. Le ovaie aumentano di volume e presentano follicoli di 2 o 3 mm dall'aspetto traslucido. La secrezione di estrogeni in questo momento supera i 20 pg/ml e può essere determinata grazie al dosaggio dell'estradiolo nel siero (Axner et al, 2008). Durante la

fase follicolare la concentrazione plasmatica di E_2 aumenta rapidamente, rimane elevata per tre o quattro giorni e improvvisamente inizia a diminuire. Generalmente un giorno prima dell'inizio di questa fase la quantità di estrogeni è inferiore a 12-15 pg/ml; il primo giorno aumenta a 25 pg/ml, raggiungendo la quota di 45 pg/ml il terzo e la quota massima di 50 pg/ml il quinto. Dopodiché inizia a scendere, ritornando a 20-25 pg/ml il settimo giorno e in genere ritorna a livelli di 10 pg/ml al decimo (da notare che né l'esposizione al maschio né l'ovulazione influenzano la diminuzione delle concentrazioni ormonali). Dato che la concentrazione media di E_2 al giorno 8 è minore di 15 pg/ml, questo momento è considerato l'inizio dell'interestro (Johnston et al, 2001).

Per quanto riguarda invece il meccanismo alla base dell'ovulazione, fondamentale è che si verifichi il coito, atto che produce un riflesso neuro-umorale a causa dallo sfregamento delle spicole peniene sulla mucosa vaginale: in seguito a ciò vengono liberati dei releasing factors da parte dell'ipotalamo. Questi ultimi determinano la secrezione di ormone luteinizzante (LH) che porta all'ovulazione entro 24-48 ore dalla copula. In alcune gatte un solo accoppiamento porta all'ovulazione, in altre sono necessari rapporti ripetuti, forse anche perché alcune gatte accettano la monta prima della maturazione totale degli oociti. Nonostante la peculiarità della specie felina, è dimostrato che nel 30% delle gatte l'ovulazione può essere spontanea (Gudermuth, 1997).

- Interestro o postestro: durante la stagione di attività ovarica la gatta ha molteplici fasi di recettività sessuale (estro). Queste sono associate a delle "ondate" di funzionalità follicolare intervallate da brevi lassi di tempo durante i quali le ovaie non sono attive: questi periodi sono definiti "interestro" o "postestro". Questa fase è caratterizzata da bassi livelli di estrogeni ($E_2 < 20$ pg/ml) e di progesterone ($P_4 < 2,0$ ng/ml) e dalla graduale scomparsa dei segni estrali. Per tutta la sua durata (mediamente di 21 giorni, con un intervallo di 14-28 nella femmina non accoppiata) il livello di E_2 rimane basale. Una monta sterile o fittizia può invece essere seguita da ovulazione e da un periodo di circa 40-45 giorni in cui i corpi lutei rimangono funzionanti dopodiché regrediscono spontaneamente (corrisponde alla pseudogavidanza della cagna). In alcuni soggetti sono state osservate fluttuazioni cicliche della concentrazione di estrogeni nei casi in cui il livello minimo fosse superiore ai 20 pg/ml (Johnston et al, 2001). Di norma però la gatta in questo periodo ritorna ad avere un comportamento normale, non attrae più i

maschi e non accetta la monta; scompaiono le vocalizzazioni, i rotolamenti e gli intensi sfregamenti.

- **Anestro:** è una fase caratterizzata da riposo sessuale nella quale le ovaie sono piccole e i follicoli sono della dimensione di 0,5 mm di diametro. Le gatte in questa fase non attraggono i maschi e non mostrano atteggiamento di estro o altri segni di attività ovarica. Esso si verifica nel 90-95% circa delle gatte ed inizia ad ottobre e termina a dicembre; esiste comunque una certa variabilità individuale ed è sicuramente influenzato dalle ore di luce diurna (infatti l'anestro termina non appena le giornate iniziano ad allungarsi dopo il solstizio d'inverno). E' possibile ritardarne l'inizio mantenendo le femmine esposte ad almeno 10 ore di luce artificiale al giorno (equivalenti ad una lampadina da 100 watt in una stanza di 4x4 metri): in questo modo le gatte continuano a ciclare per tutto l'anno (Concannon et al,1983). I livelli ormonali ricalcano sia per gli estrogeni che per il progesterone i valori presenti nella fase di interestro.

Da sottolineare che è molto difficile distinguere una gatta ovariectomizzata da una in riposo sessuale.

Se al coito segue il concepimento, la gravidanza dura 63 giorni. Questo prolungamento della fase luteale è presumibilmente dovuto alla produzione di P₄ placentare o alla secrezione di una gonadotropina placentare che prolungherebbe la vita dei corpi lutei gravidici.

Manifestazioni comportamentali della gatta in estro

La femmina in estro generalmente manifesta evidenti variazioni del comportamento. Come anche nel proestro, struscia continuamente testa e collo contro qualsiasi oggetto, tende a rotolarsi e a strofinare il posteriore sul pavimento "strisciando". Vocalizza molto più di frequente, spesso producendo una sorta di lamento; può urinare ripetutamente ed essere più irrequieta, manifestando il desiderio di allontanarsi da casa. Alcune femmine divengono più aggressive. Il proprietario nota soprattutto un aumento dei gatti maschi che si aggirano attorno casa.

Quando viene coccolata da una persona o avvicinata da un maschio, la gatta cessa di comportarsi come sopra descritto e si mette in una posizione particolare: si accuccia con gli arti anteriori e il tronco premuti al suolo ("a sfinge") e, iperestendendo il posteriore, alza il bacino e

presenta la regione perineale (posizione di lordosi). Può inoltre deviare lateralmente la coda e compiere dei passetti coi posteriori in risposta al contatto con l'uomo o con un maschio (Aggugini et al, 1998g; Feldman et al, 2004).

La gatta in estro permette al maschio di avvicinarsi e di afferrarla per la collottola (cosa che in proestro non avviene ancora); una volta che la presa è salda, la posizione di lordosi viene ulteriormente accentuata per favorire la monta. La penetrazione segue a diverse spinte copulatorie, e l'eiaculazione si verifica subito dopo l'intromissione (2-4 secondi). L'accoppiamento vero e proprio è talmente rapido che raramente viene osservato del proprietario, mentre è molto più facile osservare il comportamento che segue l'unione, cioè la cosiddetta "reazione post-coitale" della gatta. Infatti immediatamente dopo l'intromissione, la gatta emette un miagolio acuto al quale segue subitanea interruzione del contatto con il maschio; la femmina lo aggredisce a zampate e tenta di graffiarlo. Una volta liberatasi del maschio, si mette in disparte e si strofina vigorosamente al suolo rotolando e dimenandosi, interrompendosi solo per leccare l'area vaginale. La durata di questa fase può variare da 30 secondi a 9 minuti, durante i quali la gatta respinge attivamente qualsiasi altro tentativo di avvicinamento dei maschi. (La reazione del gatto a questo comportamento è sorprendentemente passiva: rimane infatti ad una certa distanza dalla femmina e sembra ignorarla; il maschio con una certa esperienza si mantiene lontano per evitare l'aggressione della gatta, mettendosi seduto o disteso e leccandosi occasionalmente il pene. Dopo alcuni minuti tenta cautamente un nuovo approccio e, se respinto, si rimette comodo ed attende. Questa sequenza di comportamenti si ripete finché la gatta non è nuovamente pronta ad accoppiarsi). Dopo che la reazione post-coitale è terminata, la femmina sollecita nuovamente l'attenzione del maschio allungandosi davanti a lui o toccandolo con una zampa; a ciò seguono numerosi nuovi rapporti, ad intervalli più lunghi dopo ogni ulteriore accoppiamento; si può arrivare a 30 volte in 24 ore e 36 volte in 36 ore (Concannon et al, 1983). La media di coiti per estro non è però mai stata determinata.

Nel caso di una gatta particolarmente timida, inesperta o gerarchicamente inferiore il comportamento estrale può non essere così evidente; in questi casi è utile mantenere la femmina in un ambiente familiare per permetterle di manifestare liberamente il calore, poiché potrebbe essere intimidita anche dalle variazioni ambientali (Johnston et al, 2001). È evidente quindi come anche l'aspetto psicologico sia piuttosto rilevante.

1.5 La citologia vaginale nella gatta

La colpocitologia è un sistema diagnostico che con una spesa molto contenuta e in pochissimo tempo permette di acquisire importanti informazioni. Non è molto utilizzata nella pratica della medicina felina, ma si rivela utile soprattutto nei casi di cicli poco o per nulla evidenti: ad esempio nel momento in cui il soggetto in questione non manifesti i segni dell'estro per le più svariate motivazioni (una femmina timida ad esempio, oppure gerarchicamente inferiore in una colonia): in questo caso fare degli strisci una o due volte la settimana per un periodo di due mesi, specialmente in febbraio e marzo, permette di verificare la presenza e l'andamento del ciclo. Gli strisci vaginali possono essere eseguiti anche dopo l'accoppiamento per determinare la presenza di eiaculato e se gli spermatozoi sono fertili (Feldman et al, 2004).

La principale applicazione rimane comunque determinare la fase del ciclo estrale, considerando che la morfologia delle cellule epiteliali che esfoliano dalla parete vaginale varia in funzione della presenza o meno di estrogeni. In ogni momento del ciclo la proporzione tra le popolazioni cellulari si modifica: osservando gli strisci prodotti prelevando le cellule con un tampone dopo averli colorati è possibile determinare con buona approssimazione lo stadio del ciclo (Johnston et al, 2001; Feldman et al, 2004). Di seguito si riportano i vari pattern osservabili al microscopio ottico associati alla fase del ciclo nella quale compaiono.

- Proestro : La principale variazione nella citologia dello striscio vaginale consiste nel cosiddetto aspetto di "clearing" del vetrino, cioè l'assenza di detriti cellulari e di filamenti di muco e la mancanza di aggregazione delle cellule epiteliali cheratinizzate. I responsabili di questo particolare aspetto sono gli estrogeni, che "liquefanno" il muco vaginale; infatti il suddetto pattern è il principale e più sensibile indicatore dell'attività estrogenica nella gatta dal punto di vista citologico. Inoltre le cellule epiteliali vaginali divengono più facilmente osservabili in concomitanza con la riduzione dei detriti di fondo dello striscio, ed è possibile stabilire a quale classe appartengano. Il fenomeno del "clearing" si osserva due giorni prima dell'inizio della fase follicolare in circa il 10% delle femmine; se viene osservato prima che divenga evidente il comportamento tipico dell'estro siamo sicuramente nella fase di proestro. La progressiva variazione della morfologia delle cellule epiteliali corrisponde all'aumento della secrezione di E_2 .
- Estro : sono due gli aspetti principali osservabili nello striscio vaginale di una gatta in questa fase: il primo è l'aumento del clearing nel vetrino (che raggiunge il massimo in

questo stadio durante la fase follicolare) ed il secondo è la redistribuzione della percentuale di ogni tipo cellulare. Le cellule cheratinizzate aumentano dal 10% del primo giorno dell'estro fino a oltre il 40% del totale tra il quarto ed il settimo, per iniziare poi a diminuire di nuovo per tornare ai valori iniziali. Le cellule nucleate invece si mantengono attorno al valore del 40-60% per tutta la durata di questa fase.

- **Interestro** : in questa fase dominano la scena le cellule nucleate superficiali e le cellule intermedie. Il rapporto tra le sottopopolazioni è in genere il seguente: parabasali 2%, intermedie 48% e superficiali 46%, per un totale di 96 cellule nucleate su 100. Sono possibili fluttuazioni nelle proporzioni ma le cellule cheratinizzate normalmente non superano il 4% del totale. Sono presenti sullo sfondo anche detriti cellulari e filamenti di muco.
- **Anestro** : il pattern che si osserva è molto simile a quello della fase precedente, con un lieve aumento della percentuale di cellule parabasali (fino al 10%) e intermedie (fino al 70%). Il fondo dello striscio è molto ricco di muco in filamenti.

Nella sezione "Allegati" sono riportate delle immagini esemplificative di alcune fasi del ciclo della gatta tratte dalla documentazione fotografica degli strisci prodotti durante lo studio.

1.6 Scopo della tesi

Considerata la fisiologia della riproduzione nel gatto ed il fatto che, come è stato detto, l'endocrinologia e l'asse ormonale del maschio sono praticamente sovrapponibili a quelli della femmina, è plausibile un effetto simile di questo agonista in entrambi i sessi. Perciò il Deslorelin è potenzialmente applicabile in tutte le situazioni che richiedono una soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade e della produzione di ormoni sessuali quali la sterilizzazione, la riduzione dell'aggressività e l'ipertrofia prostatica benigna.

Questo studio si propone quindi di valutare l'efficacia dell'impianto sottocutaneo a lento rilascio a base del GnRH-agonista Deslorelin nel controllo della funzione riproduttiva nel gatto adulto. Lo scopo specifico è misurare l'effetto di un impianto da 4,7 mg di Deslorelin Acetato sulla concentrazione plasmatica di testosterone e progesterone, sui caratteri sessuali secondari e sul comportamento e sulla comparsa dell'estro nelle femmine. Come già detto, la risposta endocrina ad un trattamento continuo con GnRH agonista si caratterizza dalla successione di due diverse fasi: la fase acuta, che può durare alcuni giorni e prevede un picco di FSH ed LH, e la

fase cronica, durante la quale c'è desensibilizzazione dei recettori per il GnRH. Quello che si auspica nel gatto è una reazione al trattamento cronico con questo principio attivo simile a quella del cane, con conseguente inibizione della produzione di testosterone e quindi del comportamento aggressivo o sessuale nel maschio, e nella femmina la soppressione del comportamento estrale e il mantenimento del progesterone a livello basale.

Poiché il prodotto da noi testato determina la sterilizzazione reversibile abbiamo ritenuto opportuno valutare se gli effetti da esso prodotti sul comportamento e sul peso possono essere paragonabili a quelli determinati dalla castrazione chirurgica.

2 MATERIALI E METODI

2.1 Animali sperimentali

Lo studio è stato effettuato in 12 soggetti dei quali 5 femmine e 7 maschi (tabella n° 2.1). In principio il campione era composto di soli soggetti maschi, ma a sperimentazione iniziata si è prospettata la possibilità di testare l'impianto anche su delle gatte, perciò la durata della prova differisce tra i due gruppi.

Il gruppo dei maschi è eterogeneo per peso, età, provenienza e alimentazione. I soggetti n°1, 2, 3, 4 sono gatti da sempre abituati alla vita all'aperto; sono liberi di muoversi all'esterno delle abitazioni dei rispettivi proprietari e si nutrono di cibo commerciale umido o secco. Sono tutti maschi interi di razza Europea che si sono accoppiati con successo almeno una volta con femmine che vivono nella stessa abitazione/zona, dato che tutti vivono in promiscuità con altri gatti di entrambi i sessi, ad eccezione del soggetto 1 "Felix" che vive da solo perché non tollera la presenza di altri gatti. Il soggetto 2 "Punto" convive con una giovane gatta intera. Il gatto 3 "Momi" vive con una gatta intera e un altro maschio intero. Il soggetto 4 "Gatto" convive con la sorella, sterilizzata, e confina con altri maschi e femmine interi. I soggetti 5, 6, 7 invece vivono nella stessa abitazione, sono tutti maschi interi che non si sono ancora accoppiati ma hanno chiaramente manifestato i segni di maturità sessuale. Questi ultimi tre soggetti vivono in casa con la possibilità eventuale di uscire e sono nutriti con cibo commerciale prevalentemente secco; convivono parzialmente con una gatta sterilizzata. Nessuno di questi soggetti è vaccinato né finora ha mai manifestato patologie degne di nota o subito interventi chirurgici.

Il gruppo delle femmine è composto da cinque gatte europee, intere, di provenienze diverse, delle quali quattro possono vivere sia fuori che dentro casa, mentre una (n°1 "Azzurra") vive solo in casa, anche se avrebbe la possibilità di uscire tramite una porticina nella porta di casa. Ognuna di loro è di provata fertilità, in quanto almeno una volta si sono accoppiate con successo e hanno partorito una cucciolata sana. L'età varia da 1,5 a 6 anni al momento dell'inizio dello studio. Tutte le gatte vengono alimentate con cibo secco due volte al giorno. Nessuna di queste ha mai avuto problemi rilevanti, eccetto la gatta n°2 "Jamie" che ha sofferto di cistite ed ha avuto un aborto durante la prima gravidanza (all'età di 8 mesi), mentre poi la seconda è andata a buon fine. La femmina n°1 "Azzurra" convive con i due figli maschi ed una figlia femmina, tutti interi; la n°2 "Jamie" anch'essa divide l'abitazione ed il territorio con le due

figlie femmine (che durante lo studio sono rimaste entrambe gravide ed hanno partorito 5 cuccioli ciascuna). La gatta n°3 "Micia" vive con altri sei gatti tra maschi e femmine, tutti interi, tre dei quali sono suoi figli. La n°4 "Teresina" convive con uno dei figli maschi avuto dall'ultima gravidanza, ma lo sopporta poco e spesso è aggressiva nei suoi confronti. Infine la n°5 "Nebbia" non divide la stessa casa con altri felini, ma nei territori confinanti sono presenti almeno tre gatti maschi interi. Solo la femmina n°2 segue un programma vaccinale, mentre le altre non hanno mai fatto alcun tipo di profilassi per le malattie infettive, ma utilizzano prodotti spot-on per la prevenzione dell'infestazione da pulci. Tutte le femmine si sono riprodotte almeno una volta con successo, sono tutte dunque di provata fertilità. In particolare, il numero di parti per soggetto è compreso tra 1 e 10: le femmine n° 1 e 4 hanno partorito una sola volta, la n°2 ha avuto due gravidanze (di cui la prima un aborto), la n° 3 ha partorito 8 volte ed infine la femmina n°5 ha avuto 10 cucciolate. Il soggetto n° 1 "Azzurra" ha avuto l'ultimo calore nel mese di aprile 2008, la gatta n° 2 "Jamie", la n° 3 "Micia" e la n° 4 "Teresina" hanno manifestato l'estro per l'ultima volta nel mese di marzo 2008; infine la n°5 "Nebbia" tra marzo e aprile. Quest'ultimo soggetto in particolare sembra molto fertile: negli ultimi due anni ogni calore è esitato in una gravidanza.

Abbiamo volutamente impiantato tutte le femmine nel mese di ottobre, quando era più probabile che fossero in anestro (a riprova dello stato del ciclo, è stato effettuato uno striscio vaginale per ogni gatta prima dell'impianto). Ogni soggetto è stato utilizzato come controllo di sé stesso monitorando i parametri di nostro interesse il mese prima dell'impianto e usandoli come punto di paragone per il confronto con i dati successivamente ottenuti.

	NUMERO	NOME	SESSO	RAZZA	ETA'	PESO (kg)
Gruppo MASCHI	1	Felix	M	Europeo	2005	4,40
	2	Punto	M	Europeo	2006	4,10
	3	Momi	M	Europeo	2007	5,10
	4	Gatto	M	Europeo	2007	3,95
	5	Birba	M	Europeo	03/2008	3,70
	6	Tigre	M	Europeo	04/2008	3,65
	7	Ugo	M	Europeo	03/2008	3,55
Gruppo FEMMINE	1	Azzurra	F	Europeo	2007	3,80
	2	Jamie	F	Europeo	2007	3,35
	3	Micia	F	Europeo	2002	3,85
	4	Teresina	F	Europeo	2007	2,65
	5	Nebbia	F	Europeo	07/2002	3,15

TAB 2.1 : Segnalamento (sesso, razza, età, peso) di ciascun gatto impiantato con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

2.2 Protocollo sperimentale

Il protocollo seguito si articola nei seguenti punti:

1. Visita clinica
2. Sedazione (solo se necessaria in funzione dell'indole del gatto)
3. Primo prelievo di sangue
4. Prelievo urine
5. Somministrazione di GnRH
6. Secondo prelievo di sangue
7. Impianto di Deslorelin

1. Visita clinica

Alla prima visita clinica ogni soggetto è stato identificato tramite segnalamento (razza, sesso, età, peso). E' stata raccolta un'anamnesi sia ambientale che individuale ponendo particolare attenzione a evidenziare patologie più o meno recenti che potessero aver compromesso la funzionalità dell'apparato riproduttore.

Per ogni soggetto è stato eseguito un esame obiettivo generale verificando: stato scheletrico e costituzione, stato di nutrizione e tonicità muscolare, stato del sensorio, segni e atteggiamenti particolari, cute e sottocute, mucose apparenti, linfonodi esplorabili, temperatura, polso, respiro, grandi funzioni organiche.

Nei maschi è stato eseguito un esame obiettivo particolare dell'apparato genitale verificando la presenza di entrambi i testicoli nello scroto tramite ispezione e palpazione e valutando nel contempo la loro simmetria, la temperatura approssimativa e misurando il diametro scrotale per mezzo di un calibro in metallo. Il pene è stato sfoderato per vedere, oltre al colore della mucosa prepuziale, la presenza di eventuali lesioni, neoformazioni, alterazioni nonché delle caratteristiche spicole cornee.

Nella femmina ci si è limitati alla valutazione dei genitali esterni e delle mammelle, associati però ad una citologia vaginale.

2. Sedazione

E' stata effettuata solo se necessaria, in funzione dell'indole del soggetto. Il protocollo anestesiológico utilizzato è composto da un oppioide associato ad un α_2 agonista e ad un anestetico dissociativo, il tutto somministrato intramuscolo (IM) con una siringa da 1 ml tipo "insulina" Pic Indolor. I dosaggi sono i seguenti : butorfanolo 0,3 mg/kg + medetomidina 5 μ g/kg + ketamina 3mg/kg. Questa associazione determina sedazione, analgesia e scomparsa della reattività agli stimoli esterni; la durata dell'anestesia si aggira attorno ai 50 minuti con picco di efficacia a 20-30 minuti dalla somministrazione. Per evitare rotture della sedazione o mancata sedazione è necessario attendere che il farmaco raggiunga l'effetto massimo prima di stimolare il paziente. Tra gli effetti indesiderati della medetomidina si riscontrano possibile bradicardia, ipotensione (preceduta da ipertensione) e vomito (per stimolazione diretta del centro del vomito); la ketamina invece provoca spesso un cattivo risveglio, caratterizzato da delirio, disorientamento e agitazione (probabilmente per l'alterazione della percezione degli stimoli esterni). Il butorfanolo può invece causare depressione respiratoria e, di nuovo, bradicardia. Nell'insieme comunque associare questi tre principi attivi fa sì che si bilancino gli eventuali effetti collaterali di ognuno (Corletto, 2008).

3. Primo prelievo di sangue

Il prelievo è stato effettuato dalla vena giugulare ponendo l'animale in decubito sternale con testa moderatamente distesa e sollevata o eventualmente in decubito laterale; una volta effettuata una tricotomia sufficiente si è proceduto alla disinfezione locale con un primo passaggio con Betadine e secondo passaggio con alcool. In seguito l'autrice ha provveduto alla compressione manuale e al prelievo con siringa tipo PIC Indolor® Artsana da 2,5 ml 0,70 x 30 mm e ago 22 G x 11/4" o eventualmente ago corto da prelievo giugulare. Una volta prelevati circa 2 ml di sangue, sono stati inseriti in una provetta tipo Vacutainer senza EDTA per dosare il testosterone/progesterone. In occasione dei prelievi 1-3-6-9-12, oltre ai campioni di siero si è prelevata anche un'ulteriore aliquota di sangue (in una provetta con EDTA) per un esame ematobiochimico con il quale valutare lo stato di salute generale dell'animale. Tale provetta è stata capovolta lentamente per circa un minuto dopo avervi inserito il sangue per far sì che l'anticoagulante si distribuisca uniformemente in tutto il campione e non si formino coaguli.

Il primo campione di siero viene denominato "BASALE", in quanto da esso si ricava il valore appunto basale di testosterone/progesterone.

4. Prelievo urine

Dopo aver individuato la vescica tramite palpazione e aver accuratamente tricotomizzato e disinfettato l'area con Betadine e alcool in doppio passaggio, è stata eseguita la cistocentesi con siringa da 5 ml tipo PIC Indolor® Artsana 0,70x0,30 con ago da 22 G x 11/4". Sono stati prelevati da ogni soggetto almeno 3 ml di urina mentre il gatto era in decubito dorsale.

5. Somministrazione GnRH ("Fertagyl®")

Una volta inserita un'ago cannula da 22 o 24 G ("azzurra" o "gialla" a seconda della taglia del gatto) e aver provveduto a verificare di essere effettivamente in vena con la somministrazione di una piccola quantità di soluzione eparinata, sono stati iniettati 50 µg di GnRH (0,5 ml) in bolo per via endovenosa (EV) con una siringa da 1 ml tipo PIC Indolor con ago da 22 G seguita nuovamente da flushing di soluzione eparinata. Tale iniezione è stata effettuata al fine di provocare la liberazione di LH e FSH e il conseguente picco di testosterone, e per valutare eventuali effetti del GnRH sul valore del progesterone.

6. Secondo prelievo

Almeno 60 minuti dopo la somministrazione di GnRH è stato eseguito il secondo prelievo di sangue con le stesse modalità del primo. Questo secondo campione viene denominato "POST STIMOLO".

A campionamento terminato tutte le provette e le siringhe contenenti l'urina sono state portate in laboratorio avendo cura di mantenere i campioni di sangue in posizione verticale. Ognuna di esse era stata in precedenza munita dei dati del soggetto, data e ora del prelievo; ogni campione era accompagnato dalla richiesta del tipo di esame da eseguire.

Per quanto riguarda invece le urine si è proceduto a porre l'urina contenuta in ogni siringa in una provetta precedentemente contrassegnata con il nome del soggetto e successivamente sono state messe in centrifuga per essere centrifugate per 5 minuti a 1500 giri/minuto. Trascorso il tempo necessario è stato eseguito l'esame fisico del campione, valutandone colore ed aspetto; in seguito è stato effettuato il test dello stick (esame chimico) con una piccola quantità di urina e con il rimanente, utilizzando un colorante apposito per le proteine, è stato fatto l'esame del sedimento.

Ogni mese sono state scattate delle foto per documentare l'andamento della presenza delle spicole sul pene.

Alle femmine in concomitanza con il prelievo è stato fatto uno striscio vaginale con un tamponcino in cotone inumidito; tale tampone è stato rotolato su di un vetrino e successivamente colorato con metodo Diff-Quick. (vedi paragrafo 2.4)

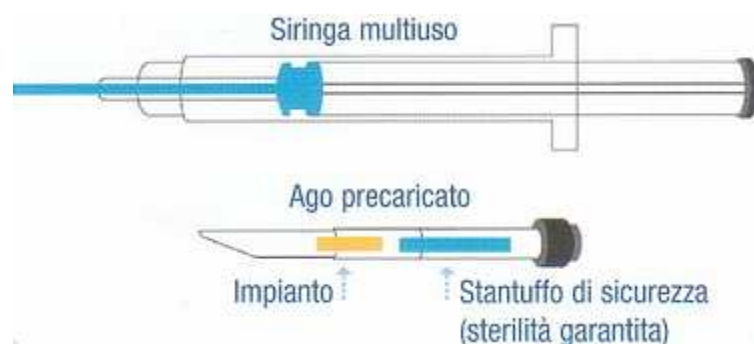
7. Applicazione del Deslorelin

Il prodotto utilizzato in questo lavoro è un analogo del GnRH, il Deslorelin acetato, presente da poco anche sul mercato italiano per uso nel cane maschio. E' un prodotto per uso veterinario brevettato in Australia e commercializzato in Australia, Nuova Zelanda, USA, Canada indicato per cani maschi interi e sani per i quali venga richiesta una riduzione temporanea e reversibile dei livelli di testosterone a valori ai quali la fertilità venga soppressa. Si propone come alternativa alle altre tecniche finora utilizzate per il controllo della capacità riproduttiva, in quanto può essere utilizzato come:

- Alternativa alla castrazione chirurgica

- Aiuto nel controllo di un carattere aggressivo
- Cura di patologie androgeno-dipendenti quali ad esempio l'ipertrofia prostatica benigna

E' un impianto in cui 4,7 mg di Deslorelin acetato sono contenuti in una matrice inerte (50 mg) costituita principalmente da un piccolo aggregato lipidico e un surfattante biologico (Suprelorin® Virbac Animal Health). Tale impianto, un cilindro solido, opaco, dal colore bianco-giallo pallido, di 2,3 mm di spessore e 12,5 di lunghezza, si trova pre-caricato sul canale di scorrimento di un ago alla cui porzione prossimale è applicato uno stantuffo.

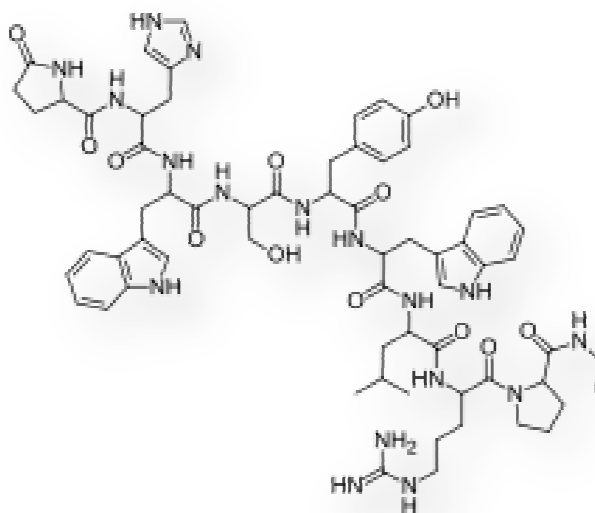


Il Deslorelin acetato, principio attivo responsabile dell'efficacia del farmaco, è un nona-peptide analogo al GnRH naturale. Rispetto a quest'ultimo il Deslorelin ha una variazione nella composizione chimica degli amminoacidi in posizione 6, 9, 10; la rimozione di una glicina C-terminale al GnRH naturale e la sostituzione della glicina in posizione 6 con un amminoacido di configurazione D è responsabile dell'aumentata e intensificata attività biologica dell'analogo del GnRH: è infatti un super-agonista.

Il Deslorelin presenta la seguente configurazione amminoacidica:

5-oxo-L-prolyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-triptophyl-L-leucyl-L-arginyl-N-ethyl-L-prolinamide.

Struttura chimica del Deslorelin:



Modalità d'azione: l'analogo del GnRH una volta somministrato stimola il rilascio di LH e FSH con una risposta farmacodinamica più rilevante rispetto all'ormone naturale, a causa della sostituzione sopra menzionata. L'effetto opposto di soppressione si ottiene regolando quantità e tempi di somministrazione. L'impianto consente un rilascio controllato del Deslorelin grazie al quale l'agonista tiene costantemente occupati (e di conseguenza eccitati) i recettori del GnRH endogeno: questi per un primo periodo rispondono adeguatamente, poi subiscono il fenomeno della "down regulation", vengono cioè desensibilizzati e poco o non più prodotti. Viene così ad essere soppressa la funzione dell'asse ipofisi-gonadi per la mancata sintesi o il mancato rilascio di LH e FSH, ormoni responsabili di mantenimento della capacità riproduttiva. Interrompendosi la cascata nelle fasi iniziali, nel maschio si blocca da parte delle cellule del Leydig la produzione di testosterone, e nella femmina il livello di progesterone e di estrogeni si mantiene nel range di valori tipico dell'anestro a causa della soppressione della funzione gonadica. Di conseguenza nel maschio viene a mancare la spermatogenesi nonché il trofismo dell'apparato riproduttore e nella femmina scompaiono le manifestazioni estrali e l'apparato riproduttore è in fase di quiescenza profonda.

Modalità d'applicazione: l'impianto è stato collocato nel sottocute della regione interscapolare mediante la siringa sterile monouso fornita dalla ditta produttrice nella confezione, sulla quale era già caricato il cilindretto. Sollevata in plica la cute, è stato inserito l'ago per tutta la sua lunghezza, dopodiché è stato spinto lo stantuffo in avanti; eseguita tale operazione, è stato retratto lentamente l'ago assicurandosi che l'impianto rimanesse in sede. Esaminati per

maggior sicurezza la siringa e l'ago, si è potuta accertare definitivamente l'avvenuta applicazione palpando la zona di inserimento: era possibile percepire il cilindro nel sottocute.

A ogni soggetto, indipendentemente da sesso, età e taglia è stato inserito un solo impianto con dosaggio di 4,7 mg di Deslorelin.

2.3 Dosaggio di testosterone e progesterone

Una volta in laboratorio, dopo che erano trascorsi almeno 15 minuti dal prelievo, le provette sono state messe in centrifuga in modo bilanciato e fatte centrifugare per 5 minuti a 3500 giri/minuto (forza $G = 2383$). Terminata l'operazione, con una pipetta mono-uso si sono prelevate le aliquote di siero che sono state poi stoccate in eppendorf preventivamente contrassegnate fino al momento di determinare i valori con la macchina. Nel momento in cui si era raggiunto un numero di campioni tale da giustificare l'accensione della macchina, sono stati eseguiti i dosaggi di testosterone e progesterone.

I vari dosaggi sono stati eseguiti tramite prove diagnosticabili in vitro con l'analizzatore Immulite (DPC Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, USA; in Italia distribuito da Medical System, Genova), uno strumento per l'esecuzione di immunodosaggi in chemiluminescenza. Il sistema è sviluppato intorno ad una provetta di reazione particolare che permette lavaggi rapidi ed accurati della sferetta sensibilizzata grazie alla forza centrifuga che si sviluppa dalla rotazione della provetta sul suo asse longitudinale. L'apparecchio in questione utilizza come fase solida delle sferette di polistirene coartate con l'anticorpo specifico all'interno di questa particolare provetta di reazione. Quest'ultima serve come contenitore per la reazione immunologica, il lavaggio e lo sviluppo del segnale. L'emissione di luce del substrato chemiluminescente che reagisce con il coniugato dell'enzima legato alla sferetta è proporzionale alla quantità di analita originariamente presente nel campione di siero. L'operazione di dosaggio prevede che i campioni di siero vengano caricati su una piattaforma a catena continua all'interno di piccoli calici ai quali sono stati applicati dei codici a barre e intervallati da provette di reazione. Le provette d'incubazione vengono introdotte nell'analizzatore per la lettura dei codici a barre e successivamente nel carosello d'incubazione. Il pipettatore aggiunge il campione e il reagente marcato all'interno della provetta di reazione e quest'ultima viene incubata e agitata per 60 minuti a 37 gradi. Le provette di reazione vengono quindi convogliate nella stazione di lavaggio-centrifugazione ad alta velocità dove avviene la separazione del legato dal libero e il liquido

espulso viene convogliato completamente nella camera laterale solidale alla provetta. Quattro o più lavaggi vengono eseguiti in pochi secondi permettendo di processare le provette in sequenza e in modo uniforme, lasciando la sferetta senza residui aspecifici. Il legato marcato viene quantificato utilizzando come substrato il dioxetano e le provette di reazione vengono trasferite al luminometro. Qui vengono lasciate incubare per 10 minuti a 37°C durante i quali il dioxetano viene idrolizzato da parte dell'enzima fosfatasi alcalina emettendo una luce il cui picco massimo si ha allo scadere del tempo di incubazione.

Le conte dei fotoni sono misurate attraverso un tubo fotomoltiplicatore. Tali valori vengono convertiti in concentrazione analitica usando curve standard memorizzate.

2.4 Citologia vaginale

Nelle femmine, in concomitanza con il prelievo mensile di sangue, sono stati effettuati degli strisci vaginali. Utilizzando dei tamponcini in cotone con manico in legno inumiditi con acqua di rubinetto si è praticato il prelievo di cellule vaginali introducendo il tampone in vagina per circa 1-2 cm, cioè finché il tampone riesce ad entrare. Una volta estratto tale tampone è stato rotolato su di un vetrino precedentemente identificato con i dati della gatta in questione scritti sulla porzione sabbiata; si è provveduto a fare 3 rotolamenti in senso orizzontale più un altro in senso obliquo (per poter poi essere certi di valutare il vetrino dal lato corretto) e una o due ultime impressioni solo con la punta del tampone, dato che proprio sulla punta si accumula una percentuale significativa di cellule.

Successivamente il vetrino è stato colorato con il metodo Diff-Quick e lasciato asciugare per il tempo necessario. Il procedimento è stato ripetuto per ogni vetrino prodotto nella stessa giornata; poi ogni vetrino è stato valutato al microscopio e ne è stata prodotta documentazione fotografica. Durante la lettura a 40 X sono state contate 100 cellule epiteliali in buono stato di conservazione valutando la percentuale di quelle cheratinizzate, in modo da poter determinare lo stato del ciclo estrale dei soggetti in analisi. Inoltre tra le cellule non cheratinizzate sono state valutate le prevalenze dei vari sottotipi (cellule parabasali, intermedie e cellule nucleate superficiali). Di ogni striscio sono state prodotte documentazioni fotografiche.

2.5 Controlli

I prelievi per i dosaggi ormonali sono stati effettuati a intervalli mensili su tutti i soggetti tranne nel soggetto n.5 Nebbia a causa di una difficoltà nel prelevare sangue a sufficienza da vene di

calibro molto piccolo. In questo caso si è perciò proceduto solo alla valutazione comportamentale e a degli stimoli a cadenza trimestrale. Negli altri soggetti invece oltre ai prelievi sopra menzionati sono stati eseguiti degli stimoli con GnRH ogni tre mesi per poter determinare il valore ormonale basale e post-somministrazione sia di testosterone che di progesterone, e valutare se in qualche modo la somministrazione di GnRH potesse influire sulla progesteronemia.

In occasione dei prelievi mensili nelle femmine è stato eseguito lo striscio vaginale e nei maschi la misurazione dei testicoli e valutata la presenza delle spicole cornee, oltre all'esame delle urine in tutti i soggetti presi in considerazione.

2.6 Modulo etologico e valutazioni comportamentali

Al fine di monitorare il comportamento dei diversi soggetti durante lo studio sono stati sviluppati due moduli etologici, uno per i maschi e uno per le femmine, riportati nella sezione "Allegati".

Sono stati compilati mensilmente intervistando i proprietari, sulla base delle loro impressioni, chiedendo di riferire qualsiasi variazione, anche se secondo loro era di scarsa importanza.

I parametri presi in considerazione sono stati i seguenti:

- Alimentazione
- Funzioni fisiologiche (minzione e defecazione)
- Comportamento sessuale
- Relazione con i co-specifici
- Relazione con l'uomo

Per ogni parametro era possibile scegliere tra la voce "come prima", che indicava che non c'era stata alcuna variazione rispetto al mese precedente, "di più", "di meno" e "non sa", nel caso in cui ad esempio il gatto viva fuori e il proprietario non sia in grado di definire la frequenza di minzione.

Inoltre è stata mensilmente annotata la variazione di peso durante la sperimentazione (in kg).

2.7 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando la procedura GLM del software SigmaStat 2.03 attraverso ANOVA con singola variabile indipendente per misure ripetute. Le variabili dipendenti sono state tutti i parametri di monitoraggio (testosteronemia, lunghezza testicolo destro, larghezza testicolo destro, lunghezza testicolo sinistro, larghezza testicolo sinistro, presenza delle spicole peniene, peso) mentre la variabile indipendente le classi di tempo di monitoraggio (Classe 1: 0 giorni dall'impianto, Classe 2: 30 giorni dall'impianto, Classe 3: 60 giorni dall'impianto, Classe 4: 90 giorni dall'impianto, Classe 5: 120 giorni dal monitoraggio, Classe 6: 150 giorni dall'impianto, Classe 7: 180 giorni dall'impianto). Le significatività sono state valutate attraverso il test di Tukey con una $P < 0,05$. Inoltre sono stati calcolati gli indici di correlazione di Pearson e valutati in particolare quelli con una significatività $P < 0,05$.

Per una questione di analisi, il valore del testosterone determinato dal laboratorio " $< 0,1$ " è stato sostituito nei grafici con " $0,09$ ".

La presenza di spicole è stata valutata tramite l'assegnazione di tre punteggi: 1 = presenza, 2 = assenza, 3 = in regressione.

Inoltre le misure testicolari (lunghezza testicolo destro, larghezza testicolo destro, lunghezza testicolo sinistro, larghezza testicolo sinistro, volume testicolo destro, volume testicolo sinistro) sono state analizzate attraverso ANOVA considerando i singoli soggetti e le classi di giorni di monitoraggio come variabili indipendenti.

3. RISULTATI

In questa sezione verranno riportati i risultati ottenuti dall'anamnesi, dall'esame obiettivo generale e particolare nonché dai test di stimolo con GnRH. Inoltre per i maschi saranno descritti gli esiti delle misurazioni eseguite sui testicoli e del monitoraggio della presenza di spicole; per la femmina verranno invece esposti i risultati degli strisci vaginali. Per entrambi saranno resi anche i dati derivanti dai moduli etologici.

Per quanto riguarda il gruppo dei maschi, sul gatto n° 1 "Felix" il principio attivo non è stato efficace. Infatti, nonostante un iniziale lento ma progressivo calo del testosterone e delle misure testicolari, dopo solo 4 mesi i parametri hanno ricominciato ad aumentare, per riportarsi ai valori iniziali; le spicole peniene non sono mai scomparse. Per i primi sei mesi è divenuto più sedentario, ma successivamente ha ripreso a vagabondare come prima del trattamento. Nel gatto n° 2 "Punto" invece, come negli altri maschi, l'impianto è stato molto efficace e rapido nel determinare dei cambiamenti. In questo soggetto dopo soli 30 giorni il livello di testosterone era sceso al di sotto dello 0,1 ng/ml e le spicole erano regredite; inoltre le misure testicolari avevano già iniziato a diminuire. I bassi livelli di testosteronemia, l'assenza di spicole e i testicoli di piccole dimensioni si sono mantenuti per tutta la durata del monitoraggio, cioè 15 mesi. Inoltre in questo soggetto sono stati osservati la scomparsa della marcatura del territorio e del vagabondaggio, nonché dell'odore sgradevole dell'urina. L'aggressività è fortemente diminuita, e in maniera inversamente proporzionale è aumentata la socievolezza. L'andamento di questo gatto è del tutto simile a quanto riscontrato nei soggetti 5, 6 e 7. In particolare per quest'ultimo c'è da dire che ha avuto un incidente d'auto al 3° mese di sperimentazione, ed ha di conseguenza dovuto subire un intervento di ortopedia piuttosto importante: nel mese successivo si è in effetti riscontrato un calo del peso di questo soggetto, ed una diminuzione dell'appetito chiaramente non dipendenti dal trattamento ma sicuramente influenti sui dati raccolti nel suddetto periodo. Anche nei gatti n° 3 e n° 4 la diminuzione della testosteronemia è stata notevole già a 30 giorni, però le spicole non sono immediatamente scomparse, ma solo regredite, per sparire completamente rispettivamente a 90 e 210 giorni. Le misure testicolari sono gradualmente diminuite anche in Momi e Gatto. In tutti i maschi l'incremento ponderale è stato notevole, con un significativo aumento dell'appetito.

Nel gruppo delle femmine la risposta al trattamento è stata omogenea, con la scomparsa dei segni estrali per tutta la durata della prova, cioè 240 giorni. La progesteronemia si è mantenuta a livelli basali, e negli strisci vaginali la prevalenza è stata di cellule non cheratinizzate. In tre femmine su cinque dopo 48 ore dall'impianto si sono avute manifestazioni estrali evidenti, anche se valutando la citologia effettuata dopo due giorni, in tutte le gatte è aumentata la percentuale di cellule cheratinizzate rispetto a quelle non cheratinizzate. L'aggressività è diminuita, mentre sono aumentate sedentarietà e socievolezza in tutte le femmine, tranne nel caso di Teresina, in cui invece si è avuto un aumento dell'aggressività. In questo gruppo non c'è stato un aumento significativo del peso.

3.1 Visita clinica e dosaggi ormonali nel maschio

Alla visita clinica il loro stato di salute è buono, solo alcuni soggetti sono lievemente disidratati, probabilmente a causa del viaggio in auto.

All' esame obiettivo generale effettuato il giorno dell'inizio dello studio tutti i soggetti presentavano uno sviluppo scheletrico buono; lo stato di nutrizione è stato stimato buono in tutti i soggetti, tranne in Momi che si presentava sovrappeso. Il tono muscolare è stato giudicato nella norma. Non sono emersi né segni né atteggiamenti particolari. Lo stato del sensorio è risultato vigile in tutti i soggetti. Cute e sottocute normali così come i linfonodi. La temperatura era nella norma in tutti i soggetti, anche se spesso tendente al limite superiore del range. (tabella 3.1.1).

Nessuno di questi soggetti è vaccinato né finora ha mai manifestato patologie degne di nota o subito interventi chirurgici.

GATTO	Peso (kg)	Sviluppo scheletrico e costituzione	Stato di nutrizione e tonicità muscolare	Stato del sensorio	Segni ed atteggiamenti e articolari	Cute e connettivo sottocutaneo	Mucose apparenti	Linfonodi esplorabili	Temperatura	Polso (bpm)	Frequenza respiratoria (atti/min)
Maschi											
Felix 3 anni	4,40	Buono	Nella norma	Molto vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	38,7 °C	130	26
Punto 2 anni	4,10	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	37,9 °C	132	24
Momi 1 anno	5,10	Buono	Sovrappeso	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	38,5 °C	132	28
Gatto 1 anno	3,95	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	37,9 °C	143	28
Birba 7 mesi	3,70	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	38,2 °C	134	24
Tigre 7 mesi	3,65	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	38 °C	128	26
Ugo 7 mesi	3,55	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	38,1 °C	136	24

Tabella 3.1.1: Esame Obiettivo Generale (EOG) dei sette gatti maschi di razza Europea sottoposti a trattamento con il Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

L'esame obiettivo particolare (tabella 3.1.2) non ha rilevato alcuna alterazione; i testicoli sono risultati entrambi presenti, simmetrici, lisci e regolari, senza noduli né presenza di aderenze. Anche il pene era nella norma in tutti i soggetti: il colore della mucosa era roseo e le piccole peniene presenti.

Nome	Esame testicoli	Presenza spicole cornee	Mucosa peniena
Felix	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme
Punto	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme
Momi	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme
Gatto	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme
Birba	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme
Tigre	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme
Ugo	Entrambi presenti, simmetrici, lisci, non caldi, né dolenti. Assenza di tumefazioni, noduli, aderenze.	SI	Rosea e uniforme

Tab. 3.1.2: Esame obiettivo particolare dell'apparato genitale dei sette gatti maschi di razza Europea (età 7 mesi-3 anni; peso medio 4,06 kg) al momento 0 del monitoraggio, cioè il giorno dell'impianto con il Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

I risultati dell'esame emocromocitometrico sono riportati nella tabella 3.1.3. Quasi tutti i parametri sono risultati nella norma ad eccezione dei leucociti (che erano alterati nei soggetti n° 2 e n° 5 con valori rispettivamente di 15.89 e 18.5 K/ μ l) e di ematocrito ed emoglobina solo nel soggetto 1. Inoltre nel soggetto n° 4 il valore delle piastrine era molto basso.

PROFILO EMATOLOGICO									
	Felix	Punto	Momi	Gatto	Birba	Tigre	Ugo	Valori di riferimento	Unità di misura
Leucociti	8,02	15,89*	12,88	9,52	18,5*	9,03	9,29	6,3-15	K/ μ l
Eritrociti	5,73	7,86	6,96	7,34	7,41	7,01	6,83	5-10	M/ μ L
Emoglobina	9,1*	10,3	10,2	11	10,4	11	10,8	10-15	g/dL
Ematocrito	27,5*	33,5	32,1	33,5	31	32,5	31,5	30-45	%
MCV	48	42,6	46,1	45,7	40	43,4	42,1	39-55	fl
MCH	15,8	13,1	14,6	15	13	13,6	13,2	13-20	pg
MCHC	32,9	30,8	31,7	32,9	31	32	31,5	30-36	g/dL
Piastrine	193	196	225	84*	507	346	355	156-800	K/ μ l
Neutrofili	58	42	50	67	63	58	71	35-75	%
Linfociti	30	51	35	24	32	35	21	20-55	%
Monociti	2	2	3	3	2	2	3	1-4	%
Eosinofili	10	5	12*	6	3	5	5	2-10	%
Basofili	0	0	0	0	0	0	0	0-0,5	%

Tabella 3.1.3: Risultati dell'esame emocromocitometrico nei sette gatti maschi (età 7 mesi-3 anni; peso medio 4,06 kg) all'inizio della sperimentazione, cioè il giorno dell'impianto con il Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health). I valori contrassegnati con l'asterisco (*) sono fuori range.

Gli esiti degli esami delle urine erano in regola, ad eccezione di qualche rara occasione in cui all'esame microscopico del sedimento sono stati riscontrati rari o rarissimi cilindri, comunque occasionali. Unico problema rilevante è stato un episodio di cistite emorragica idiopatica nel soggetto 2 "Punto" al controllo in data 05/12/2008, curata comunque con successo con una terapia a base di Enrofloxacin (Baytril®, cpr da 50 mg, mezza compressa mattina e sera per 10 gg). Al controllo successivo sono stati nuovamente effettuati sia l'esame delle urine che l'ecografia, ed il problema era risolto e non si è più ripresentato.

I gatti in questione prima del prelievo e dell'applicazione dell'impianto sono stati sedati con la seguente associazione: Butorfanolo 0.3 mg/kg + Medetomidina 5 µg/kg + Ketamina 3mg/kg in IM. Al bisogno l'anestesia è stata mantenuta con Propofol 2 mg/kg. In caso di anestesia prolungata, al termine delle pratiche è stato somministrato Atipamezolo (Antisedan®) al dosaggio di 2,5 volte la dose di Medetomidina, nel nostro caso quindi 12,5 µg/kg IM.

Il soggetto 1 non ha risposto alla prima sedazione e si è dovuto procedere ad una seconda somministrazione a dose piena; anche ai controlli successivi Felix è sempre stato più resistente agli anestetici e si è dimostrato molto aggressivo, e spesso la dose, seppur dimezzata, è dovuta essere ri-somministrata o si è dovuto ricorrere all'anestesia gassosa. Per quanto riguarda gli altri soggetti, l'anestesia è stata praticata di regola ai controlli solo a quelli in cui era veramente necessaria perché più irrequieti o aggressivi, cioè ai gatti 1, 3 e 4. Occasionalmente si sono verificati episodi di scialorrea (probabilmente dovuta alla Ketamina) e di opistotono e pedalamento da Propofol.

Nel soggetto 1 "Felix" per posizionare il catetere venoso si è dovuti ricorrere ad un mini cut-down, in quanto la cute era eccessivamente dura per far passare l'ago senza rischiare di rovinarlo.

Concentrazione sierica del testosterone

Il giorno in cui si è effettuata l'applicazione dell'impianto sono state determinate le concentrazioni di testosterone basale e post-GnRH di partenza. Grazie alla somministrazione di un bolo di GnRH in vena è stato possibile verificare se l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo era effettivamente funzionante: infatti nei gatti maschi interi normali a tale somministrazione deve seguire un picco di testosterone, che sarà più o meno ampio in funzione del soggetto (Johnstone et al, 1996). Purtroppo il soggetto 5 "Birba" è deceduto a seguito di incidente stradale a distanza di poco più di tre mesi dall'impianto, mentre il soggetto 1 "Felix" è morto (probabilmente avvelenato, ma non è stato possibile effettuare l'autopsia) dopo 14 mesi di sperimentazione.

I risultati generali dell'andamento del testosterone sono riportati nella tabella 3.1.4, mentre il grafico 3.1.1 illustra l'andamento dei valori del testosterone basale nel corso dello studio.

GATTO	Data impianto	Classi giorni di monitoraggio	Date prelievi	Concentrazione Testosterone	
				Basale (ng/ml)	Post-GnRH (ng/ml)
N°1 Felix 3 anni	05/05/08	0	05/05/2008	6,35	15,02
		30	03/06/2008	5,3	
		60	04/07/2008	3,47	
		90	30/07/2008	0,371	9,63
		120	04/09/2008	< 0,1	
		150	03/10/2008	0,188	
		180	31/10/2008	0,12	7,71
		210	05/12/2008	0,884	
		240	09/01/2009	0,104	
		270	05/02/2009	0,157	> 16
		300	06/03/2009	N.D.	
		330	09/04/2009	0,979	
		360	08/05/2009	3,17	16
		390	12/05/2009	1,36	
N°2 Punto 1,5 anni	05/05/08	0	05/05/2008	3,13	8,34
		30	03/06/2008	<0,1	
		60	04/07/2008	<0,1	
		90	30/07/2008	<0,1	<0,1
		120	04/09/2008	<0,1	
		150	03/10/2008	<0,1	
		180	31/10/2008	<0,1	<0,1
		210	05/12/2008	<0,1	
		240	09/01/2009	<0,1	
		270	05/02/2009	<0,1	<0,1
		300	06/03/2009	<0,1	
		330	09/04/2009	<0,1	
		360	11/05/2009	<0,1	<0,1
		390	12/06/2009	<0,1	
420	16/07/2009	<0,1			
N°3 Momi 1,5 anni	03/10/08	0	03/10/2008	0,1	4,46
		30	31/10/2008	<0,1	
		60	05/12/2008	<0,1	
		90	09/01/2009	<0,1	<0,1
		120	05/02/2009	<0,1	
		150	06/03/2009	<0,1	
		180	09/04/2009	<0,1	<0,1
		210	08/05/2009	<0,1	
		240	12/06/2009	<0,1	
		270	16/07/2009	<0,1	<0,1

N°4 Gatto 1,5 anni	03/10/08	0	03/10/2008	0,398	6
		30	31/10/2008	<0,1	
		60	05/12/2008	<0,1	
		90	09/01/2009	<0,1	<0,1
		120	05/02/2009	<0,1	
		150	06/03/2009	<0,1	
		180	09/04/2009	<0,1	<0,1
		210	08/05/2009	<0,1	
		240	12/06/2009	<0,1	
		270	16/07/2009	<0,1	<0,1
N°5 Birba 7 mesi	24/10/08	0	24/10/2008	0,678	6,79
		30	28/11/2008	<0,1	
		60	29/12/2008	<0,1	
		90	30/01/2009	<0,1	<0,1
N°6 Tigre 7 mesi	28/11/08	0	28/11/2008	0,59	5,15
		30	29/12/2008	<0,1	
		60	30/01/2009	<0,1	
		90	05/03/2009	<0,1	<0,1
		120	09/04/2009	<0,1	
		150	11/05/2009	<0,1	
		180	12/06/2009	<0,1	<0,1
		210	16/07/2009	<0,1	
N°7 Ugo 7 mesi	24/10/08	0	24/10/2008	0,722	3,67
		30	28/11/2008	<0,1	
		60	29/12/2008	<0,1	
		90	30/01/2009	<0,1	<0,1
		120	05/03/2009	<0,1	
		150	09/04/2009	<0,1	
		180	11/05/2009	<0,1	<0,1
		210	12/06/2009	<0,1	
		240	16/07/2009	<0,1	

Tabella 3.1.4 : Valori della testosteronemia basale e post-stimolo nei sette gatti maschi (7 mesi-3 anni di età) impiantati con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante tutto il periodo di monitoraggio.

Stimolazione pre-impianto

La stimolazione pre impianto è stata effettuata con 50 µg di Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet, 0,5 ml/soggetto). Dopo 60 minuti la concentrazione del testosterone è variata da $1,71 \pm 0,65$ a $7,52 \pm 2,84$ ng/ml, con rispettivamente deviazione standard pari a 2,11 e 3,48.

	Testosterone basale (ng/ml)	Testosterone post-GnRH (ng/ml)
n°1 Felix	6,35	15,02
n°2 Punto	3,13	8,34
n°3 Momi	0,1	4,46
n°4 Gatto	0,398	6
n°5 Birba	0,678	6,79
n°6 Tigre	0,59	8,34
n°7 Ugo	0,722	3,67

Tab. 3.1.5: Variazione della concentrazione sierica del testosterone pre e post GnRH in sette gatti di razza Europea (età 7 mesi-3 anni; peso medio 4,06 kg).

Dal punto di vista statistico, il T-test evidenzia che esiste una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra il valore pre e post stimolazione, variando come da tabella 3.1.5.

Stimolazione post-impianto

Le stimolazioni post impianto sono state eseguite sempre con GnRH (Fertagyl®, Intervet) al dosaggio di 50 µg (0,5 ml) EV. Come è possibile osservare nella tabella 3.1.4, già a 90 giorni di distanza dall'impianto (Test n°1) in tutti i soggetti eccetto il n° 1 "Felix" il valore di testosterone post-GnRH risultava $< 0,1$ ng/ml, cioè anche dopo lo stimolo la concentrazione ormonale si manteneva alla quota basale senza mostrare variazioni. Ugualmente ai successivi controlli i livelli dell'ormone in questione sono rimasti invariati ($< 0,1$ ng/ml). Per quanto riguarda invece il gatto n°1, a 90 giorni dall'impianto la somministrazione di GnRH ha provocato un aumento del livello di testosterone dal valore basale di 0,371 ng/ml a 9,63 ng/ml; a 180 giorni lo stimolo ha portato il valore dal basale 0,12 ng/ml a 7,71 ng/ml post-GnRH; a 270 giorni da 0,157 ng/ml a 16,1 ng/ml; a 360 giorni da 3,17 ng/ml a 16 ng/ml. Dati questi risultati si è ritenuto opportuno valutare il caso di "Felix" con particolare attenzione, perciò si rimanda al sottoparagrafo a lui dedicato nella fase di discussione.

È stato possibile effettuare degli stimoli fino a 360 giorni nei soggetti n°1 e 2, 270 nei gatti n°3 e 4, 180 giorni nei soggetti n°6 e 7 e solo 90 giorni nel soggetto n°5, deceduto prematuramente.

Si è scelto quindi di procedere all'analisi statistica solo per i dati ottenuti dai primi 180 giorni di lavoro, e considerare i successivi come evidenze di laboratorio che esprimono una tendenza, per farne un'analisi di tipo descrittivo. Per quanto riguarda i valori ottenuti tramite somministrazione di GnRH, quello che si evidenzia dall'analisi statistica è che c'è una significatività importante ($P < 0,001$) in termini di differenza tra i test n°1 e n°2 e n°1 e n°3, ma non tra il secondo e terzo test: ciò significa che rispetto al valore di testosterone post-GnRH al momento dell'impianto (test n°1=giorno 0), la concentrazione rilevata al giorno 90 e 180 è significativamente diversa, ma non c'è variazione significativa tra il tempo 90 e il tempo 180. Inoltre il valore di Delta T (cioè la differenza tra valore pre e post stimolo ai test) è anch'esso significativo ($P < 0,001$) nei tre test (Tab.3.1.6).

Test	Valori Post	Delta T
1	7,06 ± 1,45 a	5,35 ± 0,67 a
2	1,45 ± 1,36 bc	1,32 ± 1,32 bc
3	1,36 ± 1,27 bc	1,26 ± 1,26 bc
P	< 0,001	< 0,001

Tab 3.1.6 : Media e relativo errore standard medio ai test n°1, n°2 e n°3 per i valori di testosterone post-GnRH e per la differenza tra valore basale e post-stimolo (delta T) nel gruppo di 7 gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni di età; peso medio 4,06 kg) impiantati con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Andamento del valore basale del testosterone al momento dell'impianto e nei mesi successivi

I livelli di testosterone basali prima dell'impianto rientrano nel range fisiologico del gatto maschio intero adulto che varia da "non rilevabile" (ovvero $< 0,02$ ng/ml) a 23,4 ng/ml (Johnstone et al, 1996), e sono riportati nella tabella 3.1.4. Alla prima stimolazione, la media dei valori basali è di $1,71 \pm 0,86$ ng/ml, mentre di quelli post stimolo è $7,06 \pm 1,45$ ng/ml, con una differenza di 5,35 ng/ml pari ad un incremento del 412,87%. L'andamento complessivo delle concentrazioni ormonali basali durante il monitoraggio è riportato nel grafico 3.1.1, mentre l'evoluzione del valore medio di testosterone è illustrata nel grafico 3.1.2.

Si è scelto di procedere all'analisi statistica solo per i valori fino ai 180 giorni, e considerare i dati raccolti successivamente come una tendenza da valutare solo dal punto di vista clinico in maniera descrittiva.

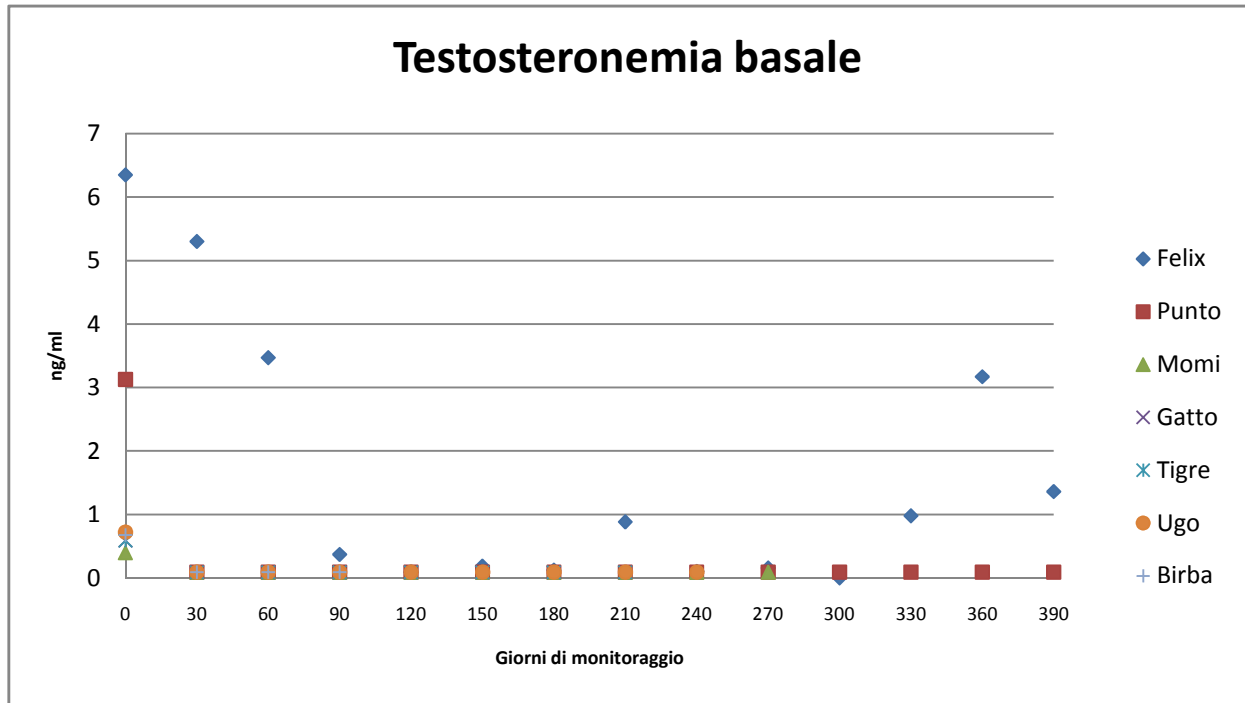


Grafico 3.1.1: andamento della testosteronemia basale nei sette gatti maschi di razza Europea (di età compresa tra 7 mesi e 3 anni; peso medio 4,06 kg) sottoposti ad impianto con l'agonista del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

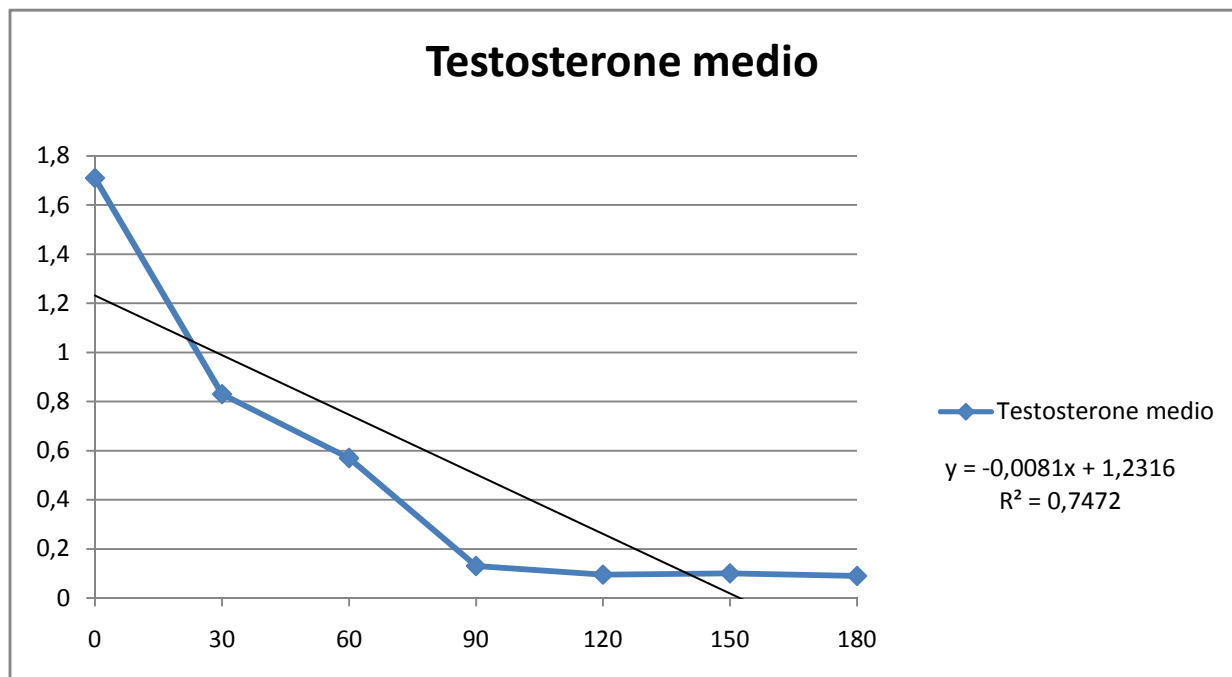


Grafico 3.1.2: Valore medio di testosteronemia nei sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni; peso medio 4,06 kg) impiantati con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante i primi 180 giorni di monitoraggio.

	Giorni	Testost.	Classi di monitor.	Lungh. Dx	Largh. Dx	Lungh. Sx	Largh. Sx	Pres. Spicole	Peso
Anni	0,03	0,54*	0	0,49*	0,36	0,58*	0,32*	-0,53*	-0,18
Giorni		-0,38*	0,99*	-0,19	-0,33*	-0,12	-0,31*	0,45*	0,37*
Testost.			-0,38*	0,54*	0,623*	0,59*	0,618*	-0,35*	-0,08
Classi di monitor.				-0,16	-0,31*	-0,09	-0,29*	0,43*	0,395*
Lungh. Dx					0,804*	0,95*	0,78*	-0,47*	0,37*
Largh. Dx						0,81*	0,96*	-0,45*	0,23
Lungh. Sx							0,81*	-0,44*	0,36*
Largh. Sx								-0,44*	0,3*
Pres. Spicole									0,09

Tab. 3.1.7 : Indici di correlazione di Pearson tra i vari parametri presi in considerazione (giorni, testosteronemia, classi di monitoraggio, lunghezza testicolo destro, larghezza testicolo destro, lunghezza testicolo sinistro, larghezza testicolo sinistro, presenza delle spicole peniene, peso) nel monitoraggio di un gruppo di sette gatti maschi di razza Europea (età 7 mesi-3 anni; peso medio 4,06 kg) trattati con un impianto a base dell'agonista del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health). La presenza dell'asterisco (*) indica una significatività statistica (P<0,05).

Testost. = Testosteronemia

Classi di monitor. = Classi di monitoraggio peniene

Lungh. DX = Lunghezza del testicolo destro sinistro

Largh. DX = Larghezza del testicolo destro sinistro

Pres. Spicole = Presenza delle spicole

Lungh. Sx = Lunghezza del testicolo

Largh. SX = Larghezza del testicolo

Mentre in tutti i soggetti il valore del testosterone già a 30 giorni è <0,1 ng/ml e si manterrà tale per tutto lo studio, nel soggetto n°1 "Felix" il livello in questione viene raggiunto solo a 120 giorni (04/09/2008) per poi tornare a salire; nel suo caso i valori ormonali si discostano molto dalla media degli altri soggetti, diminuendo molto più lentamente (nell'arco di 120 giorni contro

i 30 degli altri gatti) per poi risalire e riportarsi a livelli oscillanti tra 0,104 ng/ml (09/01/2009, 240 giorni) e 3,17 ng/ml (08/05/2009, 360 giorni).

Tempo	Testosterone	Lungh. Testicolo DX	Largh. Testicolo DX	Lungh. Testicolo SX	Largh. Testicolo SX	Presenza spicole	Peso
0	1,710 ± 0,86	1,24 ± 0,10 a	0,63 ± 0,1 a	1,23 ± 0,11 a	0,59 ± 0,1 a	1 ± 0 a	4,06 ± 0,2 a
30	0,83 ± 0,74	1,24 ± 0,12 a	0,54 ± 0,08 a	1,2 ± 0,12 a	0,56 ± 0,09 ab	1,57 ± 0,37 ab	4,32 ± 0,23 ab
60	0,57 ± 0,48	0,99 ± 0,1 ab	0,39 ± 0,07 a	1,01 ± 0,1 a	0,4 ± 0,08 ab	1,71 ± 0,29 ab	4,49 ± 0,26 bc
90	0,13 ± 0,04	0,96 ± 0,13 b	0,33 ± 0,57 b	0,9 ± 0,1 bc	0,34 ± 0,05 b	2 ± 0,22 b	4,53 ± 0,24 b
120	0,095 ± 0,05	1,02 ± 0,06 ab	0,40 ± 0,05 b	1,05 ± 0,09 a	0,43 ± 0,49 ab	2 ± 0,26 b	4,57 ± 0,27 b
150	0,1 ± 0,16	1,07 ± 0,08 ab	0,43 ± 0,06 a	1,1 ± 0,09 a	0,43 ± 0,07 ab	2 ± 0,26 b	4,8 ± 0,25 bc
180	0,09 ± 0	1,18 ± 0,13 ab	0,42 ± 0,06 a	1,2 ± 0,11 a	0,4 ± 0,04 ab	2 ± 0,26 b	4,83 ± 0,15 bc
P	0,05	0,004	0,003	0,008	0,01	0,01	0,001

Tab.3.1.8.: Valori medi dei parametri considerati (testosteronemia, classi di monitoraggio, lunghezza testicolo destro, larghezza testicolo destro, lunghezza testicolo sinistro, larghezza testicolo sinistro, presenza delle spicole peniene, peso) durante il monitoraggio e loro errore standard medio in sette gatti maschi di razza Europea (età 7 mesi-3 anni; peso medio 4,06 kg) sottoposti a trattamento con l’analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health). Lettere differenti (a, b, c, ecc.) all’interno di ogni singolo parametro indicano una differenza significativa (P almeno <0,05).

L’analisi statistica rivela che c’è una differenza e una diminuzione statisticamente significativa (P<0,05) tra i valori medi di testosteronemia basale (colonna “testosterone”, tab. 3.1.8) e se guardiamo agli Indici di correlazione di Pearson (tab. 3.1.7) noteremo che c’è una relazione negativa significativa (P<0,001) tra il valore di testosterone basale e i giorni di monitoraggio.

GATTO	Data impianto	Classi giorni di monitoraggio	Date prelievi	Testicolo Destro (mm)		Testicolo sinistro (mm)	
				Lungh.	Diametro	Lungh.	Diametro
N°1 Felix 3 anni	05/05/08	0	05/05/2008	1,8	1,1	1,8	1,0
		30	03/06/2008	1,7	0,8	1,8	0,9
		60	04/07/2008	1,3	0,5	1,3	0,5
		90	30/07/2008	1,3	0,6	1,3	0,6
		120	04/09/2008	1,2	0,5	1,3	0,5
		150	03/10/2008	1,4	0,5	1,5	0,6
		180	31/10/2008	1,6	0,7	1,6	0,6
		210	05/12/2008	1,4	0,9	1,4	0,9
		240	09/01/2009	1,5	0,9	1,5	0,8
		270	05/02/2009	1,5	0,7	1,5	0,8
		300	06/03/2009				
		330	09/04/2009	1,8	1,2	1,8	1,0
		360	08/05/2009	1,8	1,3	1,9	1,2
		390	12/05/2009	1,6	1,2	1,6	1,2
N°2 Punto 1,5 anni	05/05/08	0	05/05/2008	1,3	0,9	1,4	0,9
		30	03/06/2008	1,7	0,8	1,5	0,7
		60	04/07/2008	1,0	0,4	1,0	0,4
		90	30/07/2008	1,0	0,3	1,0	0,3
		120	04/09/2008	0,9	0,3	0,8	0,3
		150	03/10/2008	0,9	0,2	1,0	0,2
		180	31/10/2008	0,9	0,3	0,8	0,3
		210	05/12/2008	0,9	0,3	0,9	0,2
		240	09/01/2009	0,5	0,2	0,5	0,2
		270	05/02/2009	0,7	0,4	0,7	0,4
		300	06/03/2009	0,6	0,3	0,7	0,4
		330	09/04/2009	0,8	0,2	0,9	0,2
		360	11/05/2009	1,0	0,4	1,0	0,4
		390	12/06/2009	1,0	0,4	1,0	0,4
420	16/07/2009	1,0	0,4	1,0	0,5		
N°3 Momi 1,5 anni	03/10/08	0	03/10/2008	1,3	0,6	1,2	0,6
		30	31/10/2008	1,2	0,6	1,2	0,7
		60	05/12/2008	1,2	0,6	1,2	0,6
		90	09/01/2009	1,5	0,4	1,2	0,4
		120	05/02/2009	1,2	0,5	1,3	0,6
		150	06/03/2009	1,2	0,5	1,2	0,5
		180	09/04/2009	1,3	0,3	1,3	0,3
		210	08/05/2009	0,9	0,4	0,9	0,4
		240	12/06/2009	1,3	0,5	1,4	0,5
270	16/07/2009	1,1	0,55	1,2	0,5		

N°4 Gatto 1,5 anni	03/10/08	0	03/10/2008	1,1	0,4	1,0	0,4
		30	31/10/2008	1,2	0,6	1,0	0,6
		60	05/12/2008	1,1	0,6	1,1	0,7
		90	09/01/2009	0,7	0,4	0,7	0,4
		120	05/02/2009	1,0	0,5	1,1	0,5
		150	06/03/2009	1,0	0,6	1,0	0,6
		180	09/04/2009	1,2	0,4	1,2	0,4
		210	08/05/2009	0,9	0,4	0,9	0,3
		240	12/06/2009	0,8	0,3	0,9	0,3
		270	16/07/2009	0,9	0,4	0,9	0,4
N°5 Birba 7 mesi	24/10/08	0	24/10/2008	1,0	0,4	1,0	0,3
		30	28/11/2008	1,0	0,3	1,0	0,3
		60	29/12/2008	0,8	0,2	0,8	0,2
		90	30/01/2009	0,6	0,2	0,6	0,3
N°6 Tigre 7 mesi	28/11/08	0	28/11/2008	1,0	0,4	1,0	0,4
		30	29/12/2008	0,9	0,4	0,9	0,4
		60	30/01/2009	0,7	0,3	0,8	0,3
		90	05/03/2009	0,7	0,2	0,6	0,2
		120	09/04/2009	0,9	0,4	0,9	0,4
		150	11/05/2009	0,9	0,5	0,9	0,4
		180	12/06/2009	1,1	0,4	1,2	0,4
		210	16/07/2009	1,0	0,5	1,1	0,5
N°7 Ugo 7 mesi	24/10/08	0	24/10/2008	1,2	0,6	1,2	0,5
		30	28/11/2008	1	0,3	1	0,3
		60	29/12/2008	0,7	0,1	0,7	0,1
		90	30/01/2009	0,9	0,2	0,9	0,2
		120	05/03/2009	0,9	0,2	0,9	0,3
		150	09/04/2009	1	0,3	1	0,3
		180	11/05/2009	0,9	0,4	1	0,4
		210	12/06/2009	0,8	0,3	0,9	0,4
		240	16/07/2009	0,8	0,4	0,9	0,4

Tabella 3.1.9 : Misure testicolari (lunghezza e diametro) di entrambe le gonadi in sette gatti maschi di razza Europea (peso medio 4,06 kg) impiantati con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante tutto l'arco del monitoraggio.

Misurazione dei testicoli

Ad intervallo mensile sono state rilevate le dimensioni (lunghezza e diametro) di entrambi i testicoli di tutti i soggetti, ed i risultati sono riportati nella tabella 3.1.9. Nel caso del gatto n° 1 sia lunghezza che diametro diminuiscono toccando il valore minimo a 120 giorni (che in questo soggetto corrisponde all'unico momento in cui la concentrazione del testosterone si trova al picco minimo, pari a <0,1 ng/ml) per poi ricominciare ad aumentare riportandosi a misure poco inferiori alle dimensioni di partenza. Anche negli altri soggetti si nota la stessa tendenza, ma con tempistiche diverse e raggiungendo misure inferiori. Nel gatto n°2 si raggiunge una significativa diminuzione già a 60 giorni (1,0x0,4 mm) con un minimo al giorno 240 (0,5x0,2 mm); nel gatto n°3 a 210 giorni la misura più bassa è 0,9x0,4 mm; nei soggetti 4, 5, 6 le dimensioni minime si osservano al giorno 90, con rispettivamente i valori di 0,7x0,4 mm, 0,6x0,2 mm e 0,7x0,2 mm. Infine nel gatto n°7 si osserva la dimensione minima al giorno 60 (0,7x0,2 mm), dopodiché le dimensioni testicolari si manterranno a livelli appena superiori (0,9x0,2 e 0,8x0,3mm) fino al termine dello studio.

Sono state calcolate le medie della lunghezza e del diametro di ciascun testicolo ed il relativo volume medio per ogni soggetto.

Il calcolo è stato eseguito mediante la formula (lunghezza x larghezza² x 0,524) (Levy et al, 2003), che deriva da $V=4/3\pi abc$, corrispondente al volume di un ellissoide in cui:

a= semiasse della larghezza

b= semiasse lungo

c= semiasse altezza

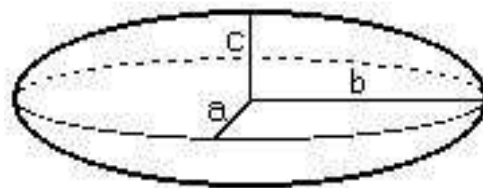


Immagine 3.1: Ellissoide preso a modello per il calcolo del volume testicolare.

Dai valori così ottenuti è stato poi ricavato il volume testicolare medio (in cm³) per il testicolo destro e sinistro (tab. 3.1.10) il cui andamento è riportato nel grafico 3.1.3. Osservando tale grafico, si nota che in linea di massima le due gonadi tendono a decrescere di volume in

maniera proporzionale, così come, una volta raggiunto il volume minimo (in media a 90 giorni), riprendono ad aumentare sempre in modo simmetrico.

	Volume medio testicolo destro (cm ³)	Volume medio testicolo sinistro (cm ³)
0	0,35 ± 0,15	0,30 ± 0,13
30	0,25 ± 0,09	0,26 ± 0,1
60	0,11 ± 0,04	0,12 ± 0,05
90	0,07 ± 0,03	0,07 ± 0,03
120	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03
150	0,12 ± 0,03	0,13 ± 0,04
180	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,04

Tabella 3.1.10: Volume testicolare medio per il testicolo destro e sinistro e rispettivi errori standard medi nei sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni di età; peso medio 4,06 kg) impiantati con l'agonista del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante i primi 180 giorni di monitoraggio.

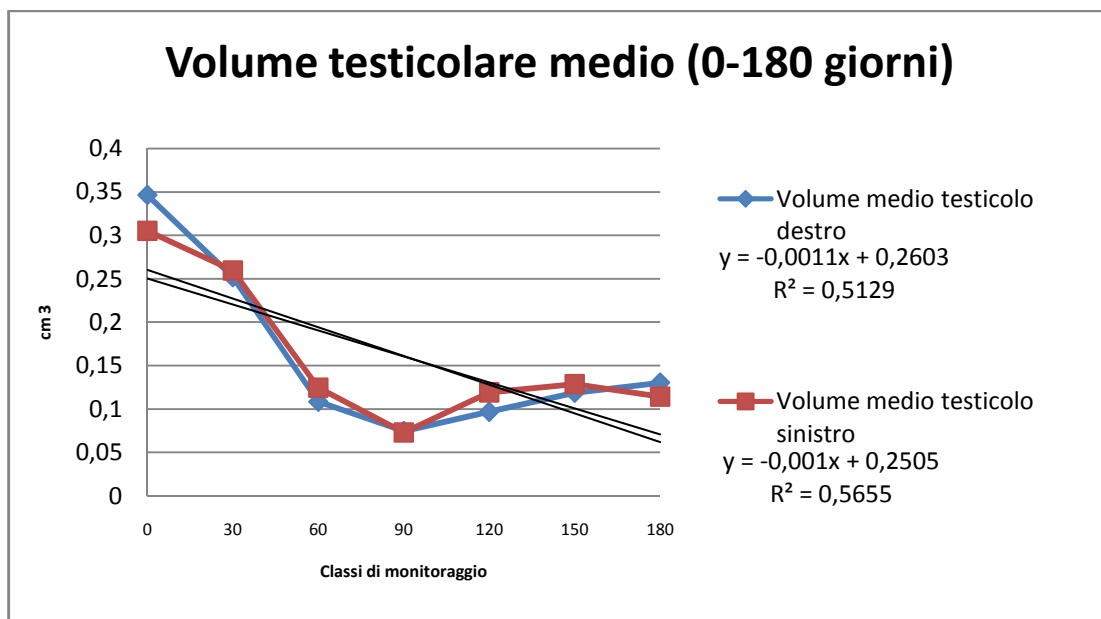


Grafico 3.1.3: Andamento del volume medio (cm³) dei testicoli destro e sinistro nei sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni di età; peso medio 4,06 kg) impiantati con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante i primi 180 giorni di monitoraggio.

La correlazione esistente tra il valore di testosterone e le dimensioni testicolari è secondo gli indici di Pearson (tab. 3.1.7) positiva e significativa ($P < 0,001$). Tra la lunghezza dei due testicoli e l'età dei soggetti esiste una correlazione significativa ($P = 0,001$) mentre sembra non esistere correlazione alcuna tra i diametri delle gonadi e gli anni dei soggetti. Se guardiamo agli indici di

correlazione tra giorni di monitoraggio e misure, notiamo che sono tutti negativi ma mentre la differenza è significativa per i diametri, non lo è per la lunghezza delle gonadi; lo stesso andamento si rileva per la correlazione tra misure e le classi di monitoraggio. Anche tra le misurazioni stesse esistono delle correlazioni, che peraltro sono altissimamente significative ($P < 1^{-9}$).

È stata analizzata anche la differenza esistente tra tutte le misure testicolari (lunghezza, larghezza e volume di entrambi i testicoli) di ogni gatto rispetto agli altri: ne è risultato che il maschio n° 1 Felix ha dei testicoli significativamente differenti dagli altri soggetti sia il giorno dell'impianto, che ai controlli successivi ($P < 0,001$); in effetti, dalla misurazione effettuata il giorno di inizio sperimentazione si nota che le misure testicolari di questo gatto sono più elevate rispetto a quelle degli altri maschi, e sono comunque maggiori rispetto alla media (che nel caso del gatto è 15 x 10 mm), e si mantengono sempre superiori al valore medio degli altri soggetti per tutto il trattamento. Inoltre la differenza permane con una certa significatività ($P < 0,03$ per lunghezza e larghezza e $P < 0,01$ per il volume) anche nel tempo: c'è infatti differenza anche tra le varie misure di Felix rispetto agli altri gatti nelle diverse classi di monitoraggio. Non c'è invece alcuna differenza significativa tra le dimensioni testicolari degli altri maschi, né tra i vari soggetti, né nel tempo. Il grafico 3.1.4 illustra invece l'andamento del volume testicolare medio fino a 240 giorni.

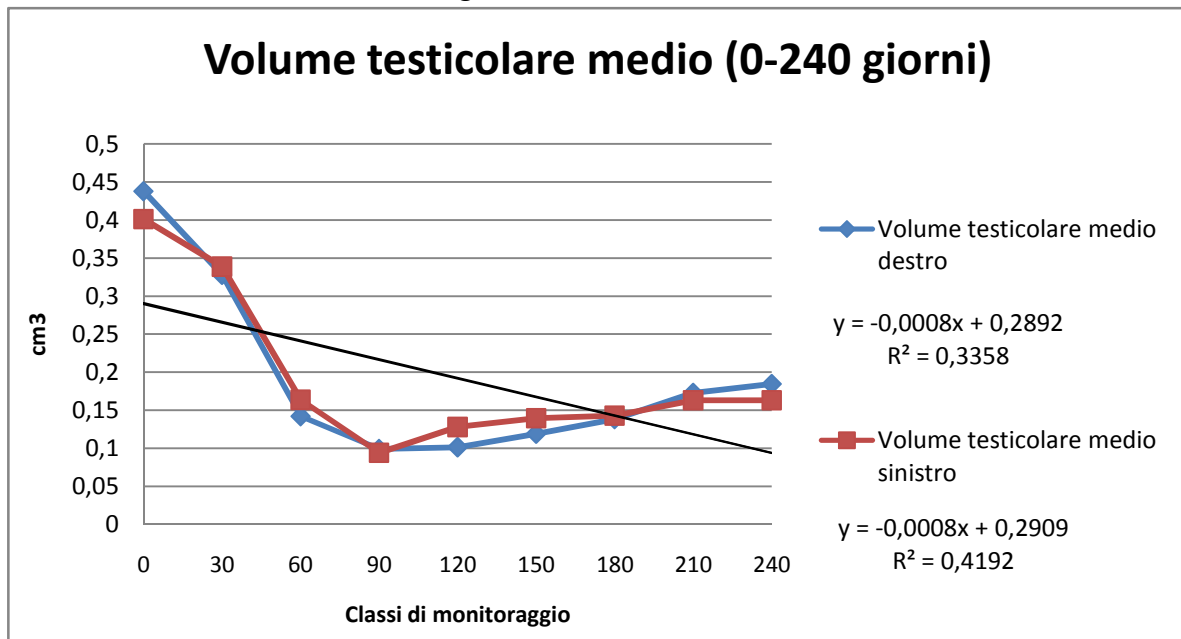


Grafico 3.1.4: Andamento del volume medio (cm³) dei testicoli destro e sinistro in cinque gatti maschi di razza Europea (età 7 mesi- 3 anni; peso medio 4,22 kg) impiantati con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) in 240 giorni di monitoraggio.

Variazioni nella presenza delle spicole peniene

Analizzando i dati prettamente clinici, cioè relativi all'osservazione diretta del pene sfoderato, si rileva che nei soggetti n°5, 6, 7 le spicole scompaiono già al giorno 60; nei gatti n°2 e 3 non si rilevano al giorno 90 e nel soggetto n°4 mancano al giorno 210 (in questo caso la regressione era iniziata già al giorno 90 ma progredita più lentamente); infine nel soggetto n°1 non sono scomparse mai. In pratica in sei soggetti su sette (corrispondente al 85,7% del totale) le spicole risultano completamente regredite al massimo entro il 210° giorno, con un picco di scomparsa al giorno 60. (grafico 3.1.5)

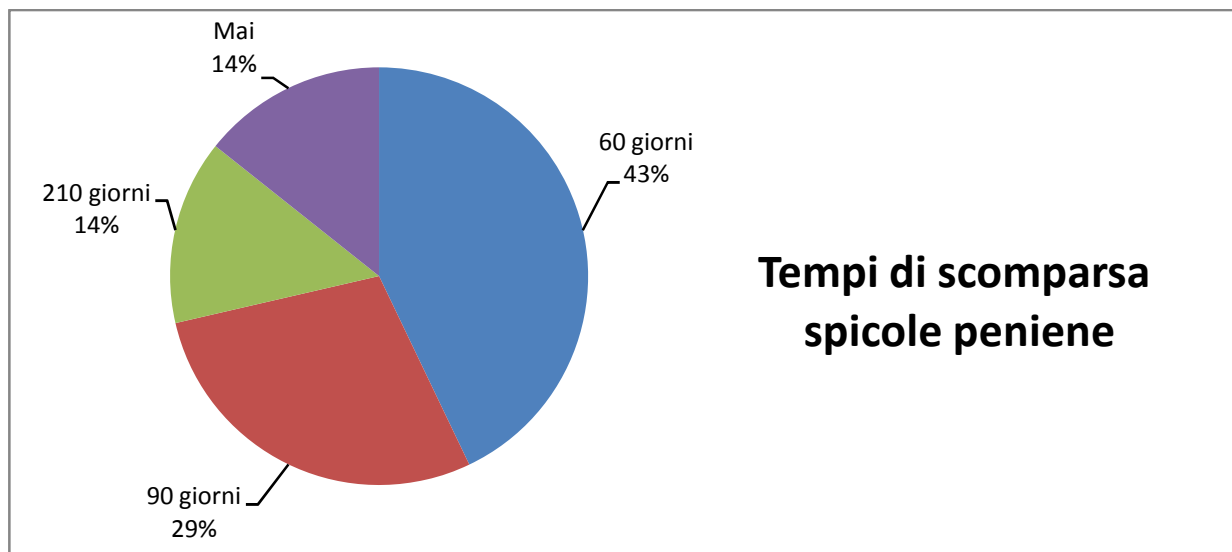


Grafico 3.1.5 : Tempistiche di completa scomparsa delle spicole peniene nei sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-4 anni; peso medio 4,06 kg) oggetto dello studio con il Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Passando invece ai dati ottenuti tramite l'analisi statistica (colonna "presenza spicole", tab. 3.1.8) possiamo affermare che esiste una significativa variazione del parametro in questione durante il monitoraggio, che comprende i primi 180 giorni di studio (grafico 3.1.6). Secondo gli Indici di Correlazione di Pearson (colonna "presenza spicole", tab. 3.1.7) c'è una correlazione negativa importante sia tra il parametro e l'età dei soggetti, che tra il parametro e il valore di testosteronemia (rispettivamente $P=0,003$ e $P=0,001$); inoltre esiste l'evidenza di un'ulteriore correlazione negativa e significativa ($P=0,001$) pure tra la presenza di spicole e la lunghezza ed il diametro dei testicoli. È presente invece una correlazione positiva (sempre significativa, rispettivamente $P=0,001$ e $P=0,003$) tra il parametro e i giorni e le classi di monitoraggio. Successivamente al periodo considerato per la statistica, i dati vengono considerati come una tendenza; le spicole continuano a non essere presenti.

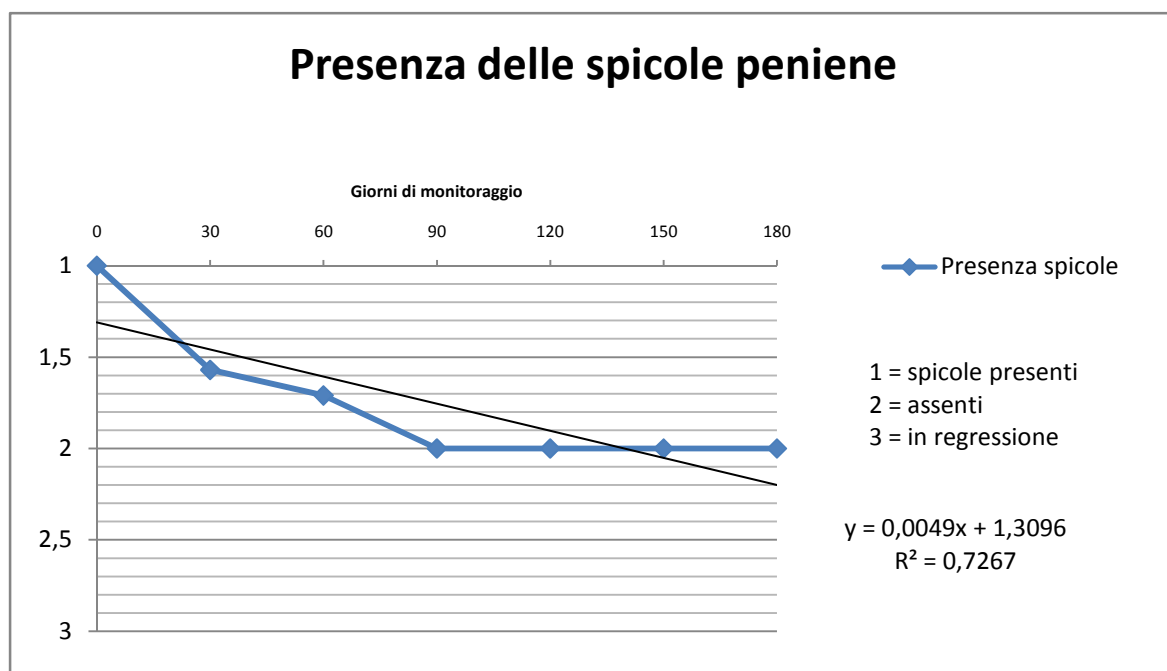


Grafico 3.1.6: Andamento della presenza delle spicole peniene nei sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni di età; peso 4,06 kg) impiantati con l’analogo del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Variazioni del peso corporeo dei soggetti

Dal punto di vista puramente clinico, cioè all’osservazione dei dati raccolti durante tutto il monitoraggio, si può notare che tutti i soggetti maschi sono aumentati di peso (tab. 3.1.11 e grafico 3.1.7). È stato possibile seguire il parametro “peso” per almeno 210 giorni, ma nell’analisi statistica ci siamo limitati a considerare solo i primi 180 giorni di monitoraggio. Tale analisi ci rivela che effettivamente esiste una differenza significativa ($P < 0,001$) tra il peso medio al giorno 0 e quello a 60-90-120-150-180 giorni, mentre non esiste tra il peso al giorno dell’impianto e quello al controllo 30 giorni dopo; inoltre sia tra il valore a 30 e a 150 giorni e tra quello a 30 e a 180 giorni sussiste la medesima significatività. (colonna “peso”, tab.3.1.8)

In tabella 3.1.7 sono riportati gli indici di Pearson, dai quali si può osservare che all’aumentare dei giorni di monitoraggio il peso è cresciuto (indice di Pearson=0,37, $P=0,01$) in maniera significativa, come pure al progredire delle classi di monitoraggio. In rapporto alla testosteronemia, il peso ha una correlazione negativa che però non è significativa, ed allo stesso modo esiste sì una relazione con la presenza di spicole, la quale tuttavia è priva di significatività.

Tempo	N°1 Felix	N°2 Punto	N°3 Momi	N°4Gatto	N°5 Birba	N°6 Tigre	N°7 Ugo
0	4,40	4,10	5,10	3,95	3,70	3,65	3,55
30	4,45	4,10	5,60	4,40	4,05	3,80	3,85
60	4,70	4,30	5,90	4,50	4,20	3,95	3,85
90	4,60	4,50	5,75	4,50	4,35	4,35	3,65
120	4,45	4,40	5,80	4,55	M	4,45	3,75
150	5,45	4,60	5,65	4,55		4,55	4,05
180	5,15	4,85	5,30	4,35		4,90	4,45
210	5,40	4,90	5,00	4,15		4,95	4,75
240	5,60	5,15	4,90	4,00			4,80
270	5,25	5,25	5,00	4,00			
300	ND	5,35					
330	5,00	5,30					
360	4,70	5,25					
390	4,75	5,30					
410		5,30					

Tabella 3.1.11: Variazioni del parametro “peso” per i sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni di età; peso medio 4,06 kg) impiantati con l’analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante tutto l’arco della prova.

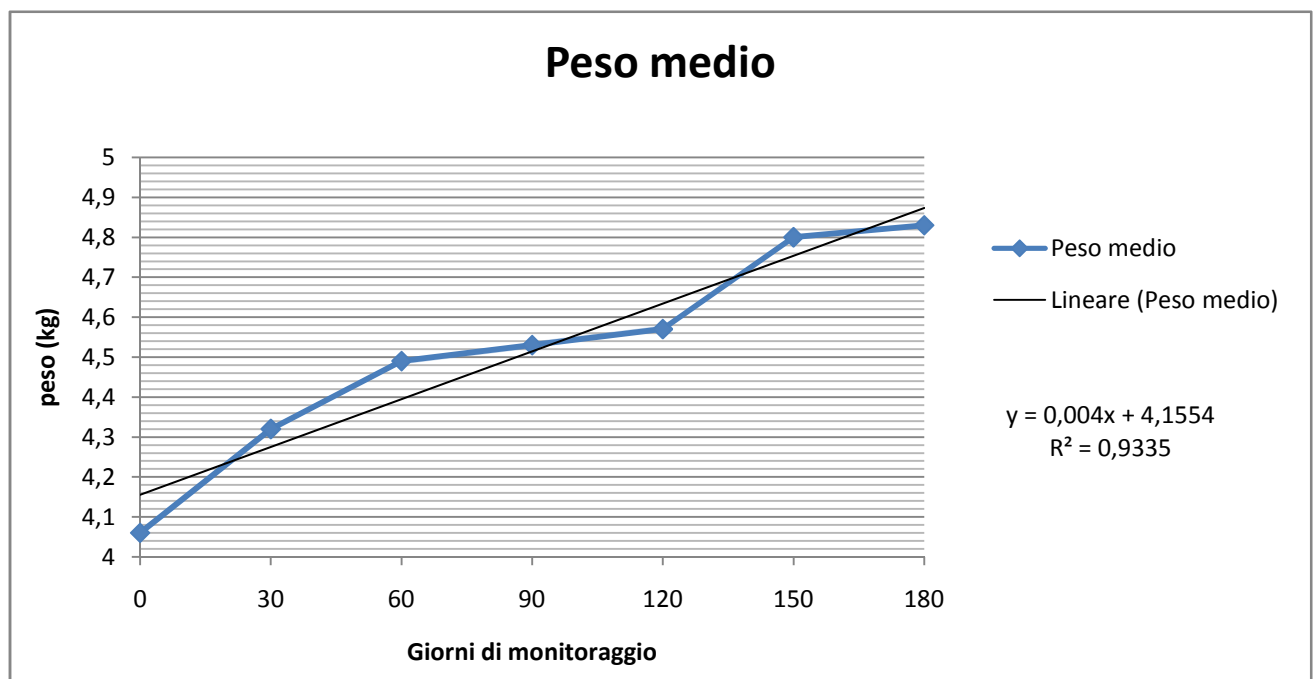


Grafico 3.1.7: Andamento del peso medio (kg) dei sette gatti maschi di razza Europea (7 mesi-3 anni) impiantati con l’analogo del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante i primi 180 giorni di monitoraggio.

3.2 Risultati del modulo etologico

I risultati complessivi derivanti dalla compilazione mensile dei moduli etologici sono riassunti nella tabella 3.2.1. In detta tabella sono stati riportati nella prima colonna di sinistra le voci che erano presenti nel modulo, e nelle colonne seguenti la variazione del parametro preso di volta in volta in considerazione per ogni soggetto. Dei dati raccolti è stata effettuata solo un'analisi descrittiva non statistica.

I parametri che hanno subito meno variazioni (o per lo meno non così marcate da essere notate dal proprietario) sono stati quelli relativi a frequenza di minzione e defecazione per i soggetti n°5, 6 e 7 che vivono in casa, mentre per gli altri che vivono prevalentemente fuori non ci sono dati disponibili.

Non è stata riscontrata alcuna modificazione per quanto riguarda l'aggressività verso l'uomo, e tutti i soggetti (eccetto il n°1 Felix) si lasciano avvicinare e toccare molto più facilmente da estranei rispetto all'inizio dello studio. I proprietari hanno notato una maggior "affettuosità" da parte dei loro animali, che cercavano più spesso il contatto e le carezze, in questo caso in parte la variazione è stata osservata anche dalla proprietaria di Felix, pur se limitatamente ai primi mesi. I parametri che hanno subito il mutamento più consistente sono stati:

- Assunzione del cibo : variazione in senso positivo elevata nell'85,7 % dei casi e lieve nel restante 14,3%.
- Quantità di alimento per pasto : incremento molto elevato nel 43% e lieve nel 57% dei soggetti.
- Frequenza di assunzione alimento : nel 71% dei gatti la tendenza all'aumento di questa voce è stata fortemente marcata.
- Marcatura del territorio : scomparsa totalmente in tutti i soggetti, eccetto nel n°1 Felix nel quale è temporaneamente diminuita all'inizio ma mai scomparsa.
- Vagabondaggio : questo comportamento è scomparso completamente in 6 soggetti su 7 (85,7%) e si è solo lievemente attenuato nel gatto n°1.
- Attività sessuale : nell'85,7% dei maschi questa necessità è del tutto scomparsa, mentre in un singolo caso è rimasta invariata rispetto all'inizio.
- Aggressività verso i co-specifici : è diminuita fortemente in 6 maschi su 7; nel singolo caso di Felix non ha subito modificazioni al confronto con il periodo pre-impianto.

Il grafico 3.2.1 illustra visivamente l'andamento delle percentuali di alcuni dei suddetti parametri.

	N°1 Felix	N°2 Punto	N°3 Momi	N°4 Gatto	N°5 Birba	N°6 Tigre	N°7 Ugo
Assunzione alimento	++	++	++	+	++	++	++
Quantità alimento	+	++	++	+	+	++	+
Frequenza assunzione alimento	+	++	++	+	++	++	++
Frequenza minzione	0	0	0	0	NV	NV	NV
Frequenza defecazione	0	0	0	0	NV	NV	NV
Marcatatura del territorio	NV	--	--	-	--	--	--
Vagabondaggio	-	--	--	--	--	--	--
Attività sessuale	NV	--	--	--	--	--	--
Aggressività verso i co-specifici	NV	--	--	--	--	--	--
Si lascia maneggiare dal proprietario	+	++	++	++	++	++	++
Si lascia maneggiare/ avvicinare da estranei	NV	++	++	++	++	++	++
Aggressività verso l'uomo	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV

Tabella 3.2.1 : Entità delle variazioni dei parametri etologici nei sette gatti maschi di razza Europea (di età compresa tra 7 mesi e 3 anni; peso medio 4,06 kg) trattati con un impianto contenente l'agonista del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Legenda : + variazione del parametro in senso positivo
 - Variazione del parametro in senso negativo
 NV nessuna variazione
 0 nessun dato

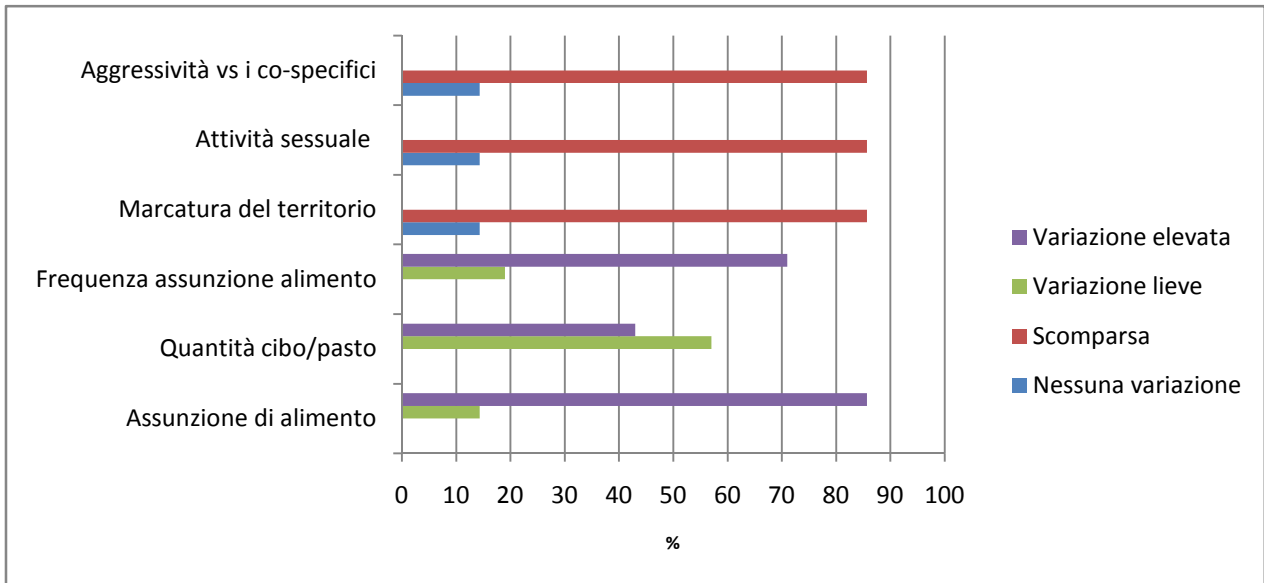


Grafico 3.2.1: Percentuali di soggetti in cui si è osservata una modificazione di alcuni parametri etologici in sette gatti maschi di razza Europea (7mesi-3 anni di età; peso medio 4,06 kg) trattati con l'agonista del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Passiamo ora ad una descrizione più dettagliata soggetto per soggetto dei cambiamenti etologici che si sono verificati.

Gatto n°1 "Felix": in questo maschio c'è stata, solo per il primo mese dopo l'impianto, una leggera inappetenza, che poi si è mutata in un appetito molto aumentato nei tre mesi successivi, per stabilizzarsi infine ad una quota di cibo comunque superiore a quella che assumeva prima dello studio. Non ci è dato sapere se ci sono state modificazioni nella frequenza di minzione e/o defecazione poiché il gatto vive sia fuori che dentro casa. La marcatura del territorio è diminuita lievemente nel corso dei primi due mesi, ma poi il gatto ha ripreso a spruzzare, e l'urina ha mantenuto decisamente l'odore forte tipico del maschio. Per quanto riguarda il vagabondaggio, tale comportamento si è attenuato nei primi sette mesi, tanto da portare il gatto a preferire rimanere in casa, cosa che prima non desiderava; ma poi pian piano ha ricominciato ad allontanarsi, con un picco di attività nei mesi di dicembre-gennaio-febbraio-marzo, in concomitanza con la ripresa del ciclo delle femmine: addirittura il dato della testosteronemia del 06/03/2009 manca, proprio perché il gatto è stato via di casa per due giorni proprio in concomitanza con la data in programma per il prelievo mensile. L'aggressività verso i co-specifici non è assolutamente diminuita, e anzi nel periodo sopra citato il gatto litigava con altri maschi e difendeva il suo territorio (al controllo del 05/02/09 gli viene curato un ascesso da morso sotto la mandibola destra). Nemmeno l'atteggiamento nei confronti degli estranei è mutato: è rimasto sempre diffidente ed evita il contatto con persone

che non conosce; con i proprietari al contrario cerca maggiormente il contatto e si lascia maneggiare.

Gatto n°2 “Punto”: anche in questo caso, poichè al gatto è permesso uscire, non possiamo sapere se ci sono state modificazioni nella frequenza di minzione/defecazione. Sicuramente, invece, c'è stato un importante aumento dell'ingestione, soprattutto nei primi sei mesi di trattamento, per poi stabilizzarsi nei mesi seguenti. Il gatto ha smesso di spruzzare dopo il primo mese di trattamento, così come di vagabondare, e l'urina non ha più avuto cattivo odore. La socievolezza è divenuta molto più marcata, preferisce stare in casa e cerca spesso il proprietario, ma non disdegna le attenzioni degli estranei, e anzi se lo accarezzano si struscia e fa le fusa. La gatta femmina intera con cui vive non attira minimamente la sua attenzione, né litiga con i maschi dei dintorni.

Gatto n°3 “Momi”: in questo soggetto l'aumento dell'appetito è stato veramente molto accentuato, tanto da farlo sfiorare l'obesità; la proprietaria ha riferito che le richieste di cibo erano così insistenti da non poter essere ignorate. Già un mese dopo l'impianto il gatto manifesta un aumento della socievolezza, gioca molto con i proprietari ma anche da solo, spesso in modo scatenato. Si osserva invece ancora una certa diffidenza verso gli estranei, che però si attenua fino a scomparire nei successivi tre mesi. Non si hanno dati per quanto riguarda un'eventuale alterazione della frequenza di minzione/defecazione, mentre la proprietaria riferisce che già dopo 30 giorni il gatto ha perso l'atteggiamento di marcatura del territorio e l'urina non ha più odore sgradevole. Inoltre non si allontana definitivamente più da casa (ma anzi preferisce stare sul divano) già dopo due mesi e non lotta più con altri maschi.

Gatto n°4 “Gatto”: questo soggetto vive sempre fuori casa, per cui non ci sono dati su minzione/defecazione. Anche in questo caso l'ingestione è aumentata, ma in maniera lieve. Il vagabondaggio e l'attività sessuale sono decisamente diminuite a 60 giorni e scomparse al terzo mese di trattamento; la marcatura del territorio ha subito un calo ma non sembra essere scomparsa del tutto fino al quarto mese. L'odore dell'urina invece è neutro già dal secondo mese in avanti. Non manifesta interesse per le femmine del vicinato, né litiga più con gli altri maschi. È diventato più socievole sia con i proprietari che con gli estranei (prima si faceva raramente prendere in braccio, ora anzi cerca di essere accarezzato), solo quando vede che deve andare nel trasportino si spaventa. All'ottavo mese di trattamento la proprietaria riferisce che il gatto “è tornato ad essere lagnoso come prima del trattamento, miagola sempre e

mangia meno”, ma le spicole sono ancora assenti, e il livello di testosterone è ancora inferiore a 0,1 ng/ml.

Gatto n°5 “Birba”: nei primi tre mesi di trattamento questo soggetto ha vissuto sia in casa che fuori, con una notevole preferenza per lo stare in casa, poi purtroppo è stato investito, per cui di lui si hanno poche informazioni. L’appetito è sicuramente molto aumentato, ma con una prevalenza di incremento della frequenza di assunzione rispetto alla quantità consumata per singola porzione. Questo soggetto defeca e urina in cassetta, per cui abbiamo dei dati in merito a queste funzioni che ci dicono che non sono variate rispetto al periodo pre-impianto. La marcatura è scomparsa così come l’odore sgradevole dall’urina. Non manifesta interesse per la femmina che vive con lui, né litiga con gli altri maschi. La socievolezza sia con i proprietari che con gli estranei è estremamente aumentata, e non manifesta nessun segno di aggressività né verso i co-specifici né verso le persone.

Gatto n°6 “Tigre”: questo soggetto ha notevolmente aumentato l’assunzione di cibo, la frequenza e la quantità di cibo per pasto, mentre è aumentata in maniera lieve e comunque proporzionalmente al cibo secco l’assunzione di liquidi. Dato che questo gatto usufruisce della cassetta, sappiamo che non si sono avute variazioni nelle funzioni di defecazione e minzione. La proprietaria segnala che già dopo 30 giorni la marcatura è scomparsa e non si avverte più l’odore sgradevole dell’urina. Il soggetto preferisce rimanere in casa e non esce se non per brevi passeggiate; non manifesta interesse per le femmine, né lotta con i maschi. È decisamente incrementata la socievolezza verso gli estranei, e si lascia maneggiare di buon grado dai proprietari.

Gatto n°7 “Ugo”: in questo soggetto sono aumentati decisamente l’assunzione di alimento e la frequenza di assunzione di cibo, mentre è incrementata in modo solo lieve la quantità per pasto. Per il resto le variazioni ricalcano quanto detto per il soggetto precedente, nonostante questo gatto sia stato investito e dopo l’intervento di ortopedia abbia dovuto fare un certo periodo di convalescenza.

3.3 Esame istologico del sito di impianto e dei testicoli del soggetto n°6

In data 04/02/2009 il soggetto n°6 “Birba” è stato investito nella strada antistante l’abitazione in cui risiedeva, ed è deceduto. Il cadavere è stato concesso dai proprietari per l’autopsia, al fine di valutare lo stato del sito di impianto e il tipo di reazione che la procedura provoca. Oltre all’istologia della zona suddetta, il dott. Sandro Mazzariol (Servizio diagnostico di Patologia e Anatomia Patologica, Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli studi di Padova) ha eseguito anche l’esame istologico dei testicoli.

Procedendo con la dissezione del tessuto cutaneo è stato ritrovato l’impianto di Deslorelin nei tessuti sottocutanei della zona della groppa, a circa 5 cm dallo spazio interscapolare, in posizione para-mediana destra. Non era presente nessuna reazione macroscopicamente evidente intorno all’impianto. Quando è stato analizzato l’istologico di cute e sottocute invece è stata osservata nello spessore del pannicolo adiposo sottocutaneo, al di sotto del derma, un’area circolare contenente frammenti di materiale esogeno amorfo, delimitato da una reazione fibroblastica di minimo spessore (1), diffusamente e gravemente infiltrato da macrofagi (3) e da una minima popolazione di linfociti (1) e fibroblasti (1) disseminati. Era presente marcata neovascolarizzazione (3) e minimo edema e congestione della parete.

Per quanto riguarda il tessuto testicolare, il referto riporta che i tubuli seminiferi sono di dimensioni costanti ed è presente edema diffuso. Sono invece assenti spermatoцитi maturi nel lume dei tubuli e dell’epididimo. La diagnosi morfologica dei tessuti sottocutanei circostanti l’impianto è stata di :*“Pannicolite granulomatosa focale lieve”*.



Immagine 3.3.1: Particolare del sito di impianto e dell'impianto stesso nel sottocute durante l'autopsia del soggetto n°6 "Birba" (gatto maschio di 10 mesi, Europeo, peso 4 kg) trattato con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health). Il gatto è deceduto causa investimento da auto. L'impianto è stato inserito nel sottocute della groppa tramite l'apposita siringa applicatrice.

Il referto per intero è riportato nella sezione "Allegati", al n°4.

3.4 Visita clinica e dosaggi ormonali nella femmina

Ogni soggetto è stato utilizzato come controllo di sé stesso, valutando i parametri di nostro interesse prima dell'impianto e usandoli come punto di paragone per il confronto con i dati successivamente ottenuti.

All'esame obiettivo generale svolto il giorno dell'impianto non sono stati rilevati problemi: lo sviluppo scheletrico era buono (nonostante il soggetto n°4 fosse di costituzione piuttosto esile) così come lo stato di nutrizione. Il tono muscolare è stato giudicato nella norma; non sono emersi né segni né atteggiamenti particolare. Lo stato del sensorio era decisamente vigile, ma gli animali non erano particolarmente agitati, eccetto Micia che si è dimostrata anche aggressiva. Cute e sottocute in genere normali (tranne per il soggetto n°4 che presentava pulci) come anche i linfonodi esplorabili. La temperatura, il polso e la frequenza respiratoria erano nella norma per tutti i soggetti, tranne nella gatta n°3, che li presentava aumentati (tabella 3.4.1).

GATTO	Peso (kg)	Sviluppo scheletrico e costituzione	Stato di nutrizione e tonicità muscolare	Stato del sensorio	Segni ed atteggiamenti particolari	Cute connettivo sottocutaneo	Mucose apparenti	Linfonodi esplorabili	Temperatura	Polso (bpm)	Frequenza respiratoria (atti/min)
Femmine											
N°1 Azzurra 1,5 anni	3,80	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Presenza di pulci	Normali	Nella norma	37,9 °C	136	26
N°2 Jamie 1,5 anni	3,35	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	37 °C	126	23
N°3 Micia 6 anni	3,85	Buono	Nella norma	Molto vigile-aggressiva	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	38,3 °C	156	30
N°4 Teresina 1,5 anni	2,65	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	37,5 °C	140	26
N°5 Nebbia 6 anni	3,15	Buono	Nella norma	Vigile	Assenti	Nessuna alterazione	Normali	Nella norma	37,8 °C	139	26

Tabella 3.4.1: Esame Obiettivo Generale (EOG) delle cinque gatte (2-6 anni di età) impiantate con l'agonista del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Con l'Esame Obiettivo Particolare abbiamo valutato l'apparato riproduttore e le mammelle; alla palpazione queste ultime erano prive di noduli o altre anomalie. Il colore della mucosa vaginale era normalmente roseo, senza eccessiva presenza di muco. Non sono state rilevate anomalie di alcun tipo.

I risultati dell'esame emocromocitometrico sono riportati nella tabella 3.4.2. Quasi tutti i parametri sono risultati nella norma ad eccezione dei linfociti, che erano più bassi della norma nel soggetto n°1 (con un valore pari al 14%), mentre l'emoglobina era sotto il limite inferiore nei soggetti n°3 e 4 con rispettivamente 9,7 e 9,5 g/dL. L'ematocrito risultava essere basso solo nella femmina n°4, anche se in realtà anche nella n°3 era appena sopra il valore minimo.

PROFILO EMATOLOGICO							
	Azzurra 1,5 anni	Jamie 1,5 anni	Micia 6 anni	Teresina 1,5 anni	Nebbia 6 anni	Unità di misura	Valori di riferimento
Peso	3,80	3,35	3,85	2,65	3,15	kg	2,5-5,5
Leucociti	13,6	10,07	8,98	7,69	8,44	K/ μ l	6,3-15
Eritrociti	7,52	6,25	6,94	6,4	6,53	M/ μ L	5-10
Emoglobina	12,6	10,5	9,7*	9,5*	11,1	g/dL	10-15
Ematocrito	38,2	31,3	30,1	28,8*	31	%	30-45
MCV	50,8	50	43,4	45,1	44,7	fl	39-55
MCH	16,67	16,8	14	14,9	15,2	pg	13-20
MCHC	32,9	33,5	32,2	33,1	32,9	g/dL	30-36
Piastrine	461	284	505	259	342	K/ μ l	156-800
Neutrofili	79	59	70	47	52	%	35-75
Linfociti	14*	32	22	45	38	%	20-55
Monociti	1	3	2	4	4	%	1-4
Eosinofili	6	6	6	4	6	%	2-10
Basofili	0	0	0	0	0	%	0-0,5

Tabella 3.4.2: Risultati dell'esame emocromocitometrico nelle cinque gatte (età 2-6 anni) all'inizio della sperimentazione, cioè il giorno dell'impianto con il Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health). I valori contrassegnati con l'asterisco (*) sono fuori range.

Gli esiti degli esami delle urine erano nella norma, ad eccezione di qualche rara occasione in cui all'esame microscopico del sedimento sono stati riscontrati rari o rarissimi cilindri, comunque occasionali. La gatta n°2 "Jamie", che in passato aveva sofferto di cistiti frequenti, soprattutto al cambio di stagione, non ha più manifestato il problema.

Le femmine sono state sedate prima del prelievo e dell'applicazione dell'impianto con lo stesso protocollo utilizzato per i maschi. Si sono verificati occasionali ma forti episodi di scialorrea e di disforia con risveglio agitato (probabilmente effetti dovuti alla ketamina) soprattutto nel soggetto n°3 "Micia", tanto che per il suo specifico caso si è deciso di diminuire il dosaggio della ketamina a 2 mg/kg. Nelle altre gatte non si sono avuti particolari problemi alla sedazione.

Concentrazione sierica del progesterone

I risultati generali dell'andamento del progesterone sono riportati nella tabella 3.4.3, mentre il grafico 3.4.1 illustra l'andamento dei valori della progesteronemia basale media nel corso dello studio.

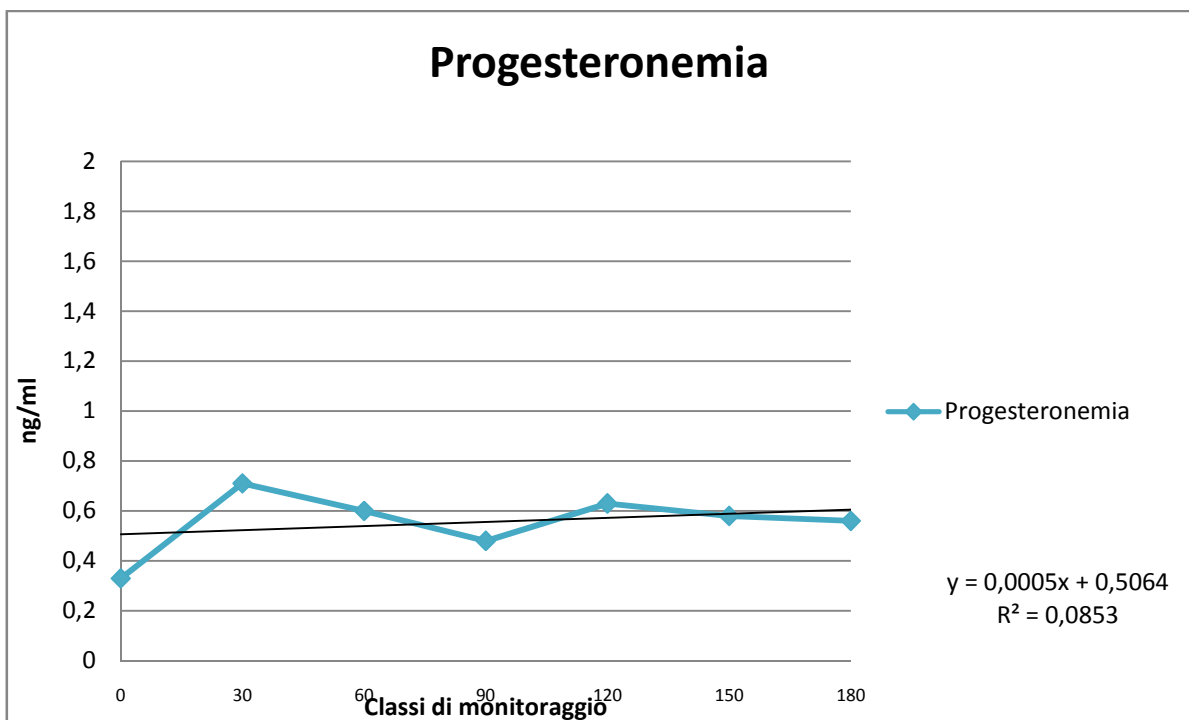


Grafico 3.4.1 : Andamento della progesteronemia nelle cinque gatte (età 2-6 anni, peso medio 3,36 kg) impiantate con un impiantato con l'analogo del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

GATTO	Peso (Kg)	Data impianto	Date prelievi	Classi di monitoraggio	Concentrazione Progesterone (ng/ml)	
					Basale	Post-GnRH
N°1 Azzurra 1,5 anni	3,8	31/10/2008	31/10/2008	0	0,33	0,49
			05/12/2008	30	1	
			09/01/2009	60	0,56	
			06/02/2009	90	0,55	0,59
			06/03/2009	120	0,84	
			09/04/2009	150	0,7	
			08/05/2009	180	0,86	0,57
			12/06/2009	210	0,7	
			16/07/2009	240	0,51	
N°2 Jamie 1,5 anni	3,35	24/10/08	24/10/2008	0	0,29	0,34
			28/11/2008	30	0,43	
			29/12/2008	60	0,55	
			30/01/2009	90	0,5	0,26
			05/03/2009	120	0,2	
			09/04/2009	150	0,33	
			11/05/2009	180	0,49	0,38
			12/06/2009	210	0,43	
			16/07/2009	240	0,41	
N°3 Micia 6 anni	3,85	31/10/2008	31/10/2008	0	0,35	0,78
			05/12/2008	30	N.D.	
			09/01/2009	60	0,73	
			06/02/2009	90	0,64	0,72
			06/03/2009	120	0,84	
			09/04/2009	150	0,7	
			08/05/2009	180	0,6	0,53
			12/06/2009	210	0,51	
			16/07/2009	240	0,69	
N°4 Teresina 1,5 anni	2,65	24/10/08	24/10/2008	0	0,36	0,45
			28/11/2008	30	0,71	
			29/12/2008	60	0,55	
N°5 Nebbia 6 anni	3,15	24/10/08	24/10/2008	0	0,32	0,37
			28/11/2008	30		
			29/12/2008	60		
			30/01/2009	90	0,25	<0,2
			05/03/2009	120		
			09/04/2009	150		
			11/05/2009	180	0,29	0,32

Tabella 3.4.3 : Risultati ottenuti durante il monitoraggio delle cinque gatte trattate con un impianto a base dell'analogo del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Stimolazione pre-impianto

Il giorno dell’impianto, prima di procedere all’applicazione, tutte le gatte hanno subito un prelievo di sangue dal quale determinare il valore di progesterone basale. Successivamente è stato effettuato lo stimolo con 50 µg di Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet, 0,5 ml/soggetto), e la concentrazione sierica dell’ormone è variata come riporta la tabella seguente:

	Progesterone basale (ng/ml)	Progesterone post-GnRH (ng/ml)
n°1 Azzurra	0,33	0,49
n°2 Jamie	0,29	0,34
n°3 Micia	0,35	0,78
n°4 Teresina	0,36	0,45
n°5 Nebbia	0,32	0,37

Tabella 3.4.4 : Variazione del valore di progesterone tra pre e post stimolo con GnRH nelle cinque gatte di razza Europea (2-6 anni di età; peso medio 3,36 kg) trattate con l’analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Stimolazione post-impianto

Le stimolazioni post impianto sono state eseguite anche nel gruppo delle femmine con Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet) al dosaggio di 50 µg (0,5 ml) EV. Come è possibile vedere dalla tabella 3.4.3, a tutti i test seguenti al primo gli animali hanno risposto mantenendo la concentrazione di progesterone a livelli tipici dell’anestro. Il grafico 3.4.2 descrive visivamente l’andamento dei valori di progesteronemia media durante i test n°1, 2 e 3 comprendenti i primi 180 giorni di monitoraggio.

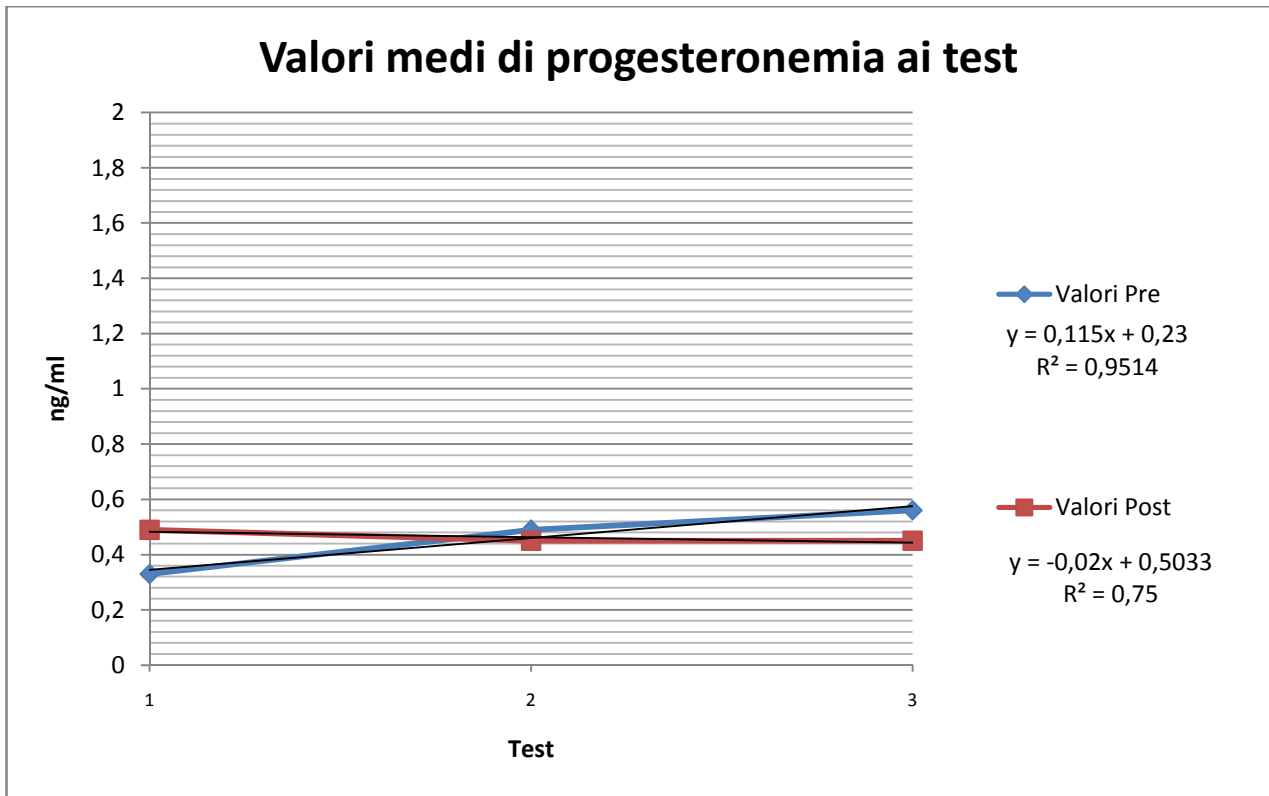


Grafico 3.4.2 : Andamento della concentrazione media di progesterone durante i tre test svolti nei primi 180 giorni di monitoraggio nelle cinque gatte di razza Europea (età 1,5-6 anni; peso medio 3,36 kg) impiantate con l’analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Andamento del valore basale del progesterone al momento dell’impianto e nei mesi successivi

Si è scelto di impiantare tutte le femmine nel mese di Ottobre, in modo da avere la ragionevole certezza che fossero in anestro (dato comunque confermato dalla progesteronemia e dallo striscio vaginale) e di partire quindi da un valore che, se si fosse mantenuto, avrebbe significato che le femmine rimanevano nella fase di anestro.

I risultati dei dosaggi ormonali a scadenza mensile sono riportati nella tabella 3.4.3. In effetti se guardiamo alla suddetta tabella, possiamo notare che la progesteronemia basale si mantiene sempre molto al di sotto di quello che è considerato il valore soglia per la fase di anestro, pari a 2,0 ng/ml (Johnston et al, 2001), fino al termine del monitoraggio (cioè fino a 240 giorni). Purtroppo però la femmina n°4 è venuta a mancare per un incidente automobilistico dopo 80 giorni di monitoraggio, per cui su di lei abbiamo pochi dati.

Nel gruppo delle femmine non è stato possibile analizzare una grande quantità di parametri come nei maschi; la parte dedicata alla statistica risulta quindi meno ampia. Nonostante ciò

l'analisi effettuata ci permette di affermare che non c'è differenza significativa tra il valore di P_4 al giorno dell'impianto e quello medio delle diverse classi di monitoraggio, né all'interno delle classi di monitoraggio stesse.

Risultati della citologia vaginale

A cadenza mensile sono stati effettuati degli strisci vaginali, uno per ogni gatta, in modo da poter seguire l'andamento del ciclo, oltre che dal punto di vista del dosaggio ormonale, anche da quello citologico. Le percentuali delle cellule cheratinizzate e non sono riassunte nella tabella 3.4.5. Nella riga "2 giorni" sono riportati i valori derivanti dalla lettura degli strisci eseguiti 48 ore dopo l'impianto e somministrazione di GnRH. Quello che possiamo notare è che rispetto alle percentuali del giorno d'impianto c'è una netta inversione del rapporto: infatti mentre al giorno 0 le cellule cheratinizzate sono in media il 14% e quelle non cheratinizzate l'86%, dopo il trattamento con Deslorelin il valore delle cellule cheratinizzate sale al 68.6%, mentre quello delle non cheratinizzate scende al 31,4%.

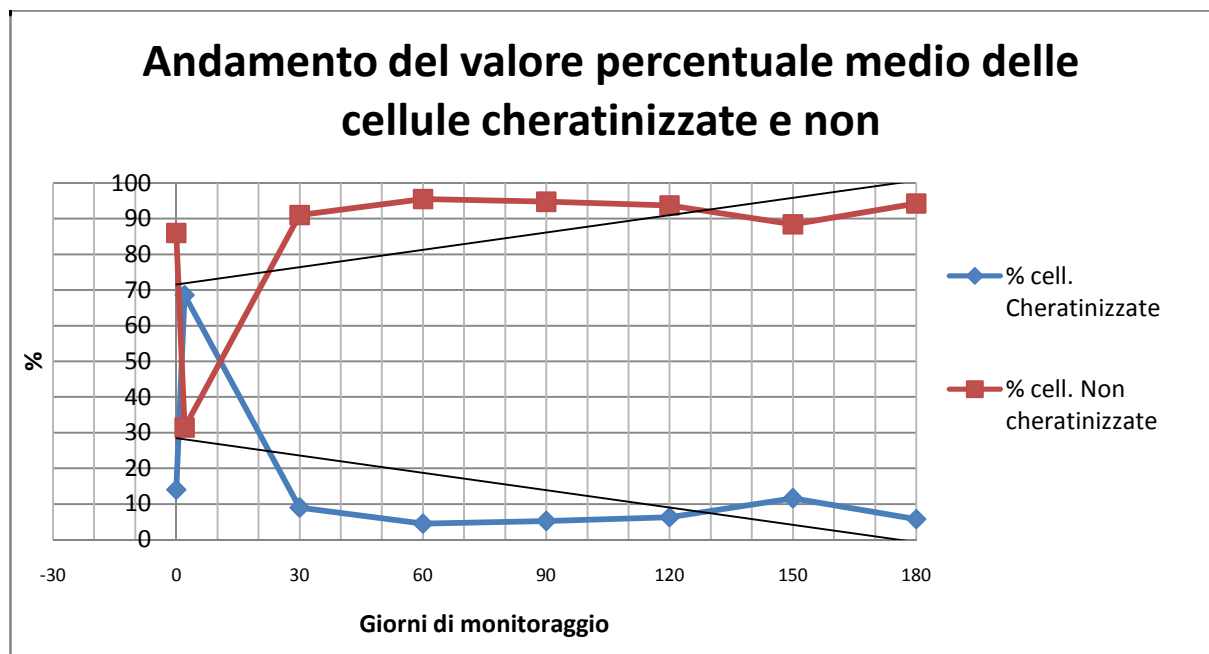


Grafico 3.4.3: Andamento del valore medio percentuale delle cellule cheratinizzate e non nelle cinque gatte (2-6 anni, peso medio 3,36 kg) trattate con l'impianto a base dell'agonista del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

	Peso (kg)	Data d'impianto	Classi di monitoraggio (giorni)	Cellule cheratinizzate %	Cellule non cheratinizzate %
N°1 Azzurra 1,5 anni	3,8	31/10/2008	0	6	94
			2	46	54
			30		
			60	8	92
			90	5	95
			120	5	95
			150	6	94
			180	4	96
			210	12	88
			240	10	90
N°2 Jamie 1,5 anni	3,35	31/10/2008	0	31	69
			2	54	46
			30	3	97
			60	3	97
			90	6	94
			120	8	92
			150	9	91
			180	11	89
			210	18	82
			240	12	88
N°3 Micia 6 anni	3,85	24/10/2008	0	3	97
			2	90	10
			30	17	83
			60	3	97
			90	5	95
			120	6	94
			150	12	88
			180	2	98
			210	5	95
			240	7	93
N°4 Teresina 1,5 anni	2,65	24/10/2008	0	18	82
			2	7	93
			30	7	93
			60	4	96
N°5 Nebbia 6 anni	3,15	24/10/2008	0	12	88
			2	40	60
			30		
			60		
			90	5	95
			120		
			150		
180	6	94			

Tabella 3.4.5: Percentuali delle cellule basali e cheratinizzate durante tutto il periodo di monitoraggio nelle cinque gatte impiantate con l'analogo del GnRH Deslorelin Suprelorin®, Virbac Animal Health). Nella riga "2 giorni" sono invece riportate le percentuali di cellule cheratinizzate e non a 48 ore dallo stimolo con il GnRH.

Per quanto riguarda invece l'andamento generale della cellularità vaginale, notiamo che i valori del comparto cheratinizzato si mantengono bassi, con un picco di 18 cellule cheratinizzate nel soggetto Azzurra a 210 giorni; fa ancora eccezione il medesimo soggetto, che al giorno dell'impianto presentava il 31% di cellule anucleate. La percentuale di cellule non cheratinizzate per contro rimane elevata, oscillando tra minimo dell'88% ed un massimo del 98%. Sono stati calcolati i valori medi per ogni classe di monitoraggio (riportati nel grafico 3.4.4, che ne illustra l'andamento).

L'analisi statistica effettuata rispetto a questo parametro rivela che non c'è differenza significativa tra la percentuale di cellule cheratinizzate e non al giorno dell'impianto e le percentuali rilevate ai controlli successivi (30-60-90-120-150-180); c'è sicuramente invece una significatività ($P < 0,001$) nella differenza tra il valore delle cellule cheratinizzate e non cheratinizzate tra il momento dell'impianto e 48 ore dall'inizio del trattamento. La differenza, sempre significativa, esiste anche tra il giorno due e tutte le altre classi di monitoraggio ($P < 0,001$).

Variazioni del peso corporeo dei soggetti

Osservando i dati raccolti lungo tutto il periodo del monitoraggio (tab.3.4.6), dal punto di vista clinico possiamo dire che la variazione del parametro "peso" all'interno del gruppo delle femmine non è poi così consistente; infatti la variazione di peso di ogni soggetto rispetto al proprio peso del mese precedente è minima, e nel soggetto n°5 "Nebbia" si nota addirittura una diminuzione del dato. Nonostante ciò, la tendenza che si evidenzia dal grafico che riporta il peso medio (grafico 3.4.4) è quella di un incremento ponderale nel corso del monitoraggio.

L'analisi statistica indica però che non c'è alcuna significatività nella differenza di peso, né tra le classi di monitoraggio, né tra i valori di ogni singolo soggetto.

Mese	N°1 Azzurra	N°2 Jamie	N°3 Micia	N°4 Teresina	N°5 Nebbia
1	3,80	3,35	3,85	2,65	3,15
2	3,75	3,20		2,80	3
3	3,90	3,40	4,15	3,15	2,95
4	4,00	3,60	4,35	M	2,85
5	3,95	3,75	4,30		2,8
6	3,90	3,65	4,25		2,75
7	3,85	3,60	4,25		2,65
8	3,95	3,25	3,95		2,70
9	4,00	3,95	4,00		2,75

Tabella 3.4.6: Variazioni del parametro “peso” per le cinque gatte (2-6 anni d’età; peso medio 3,36 kg) impiantate con l’analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante tutto l’arco del monitoraggio.

M = deceduta;

ND = non disponibile

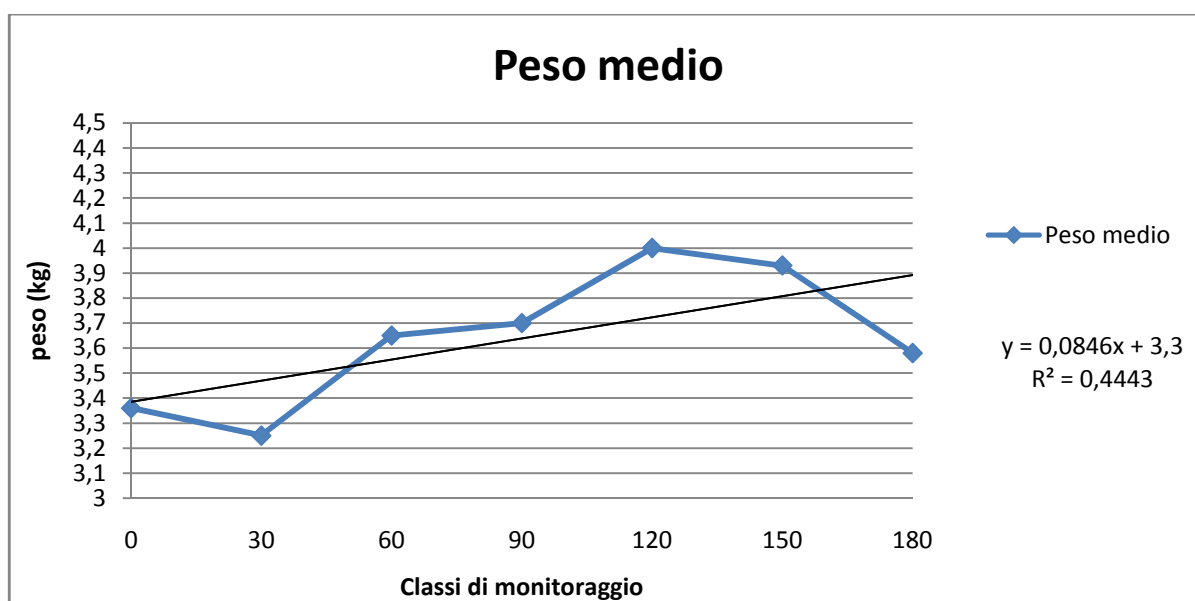


Grafico 3.4.4: Andamento del peso medio (kg) nelle cinque gatte (2-6 anni d’età; peso medio 3,36 kg) impiantate con l’analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health) durante i primi 180 giorni di monitoraggio.

3.5 Modulo etologico

I risultati complessivi derivanti dalla compilazione mensile dei moduli etologici sono riassunti nella tabella 3.5.1. In detta tabella sono stati riportati nella prima colonna di sinistra le voci che erano presenti nel modulo, e nelle colonne seguenti la variazione del parametro preso di volta in volta in considerazione per ogni soggetto.

Di detti dati è stata effettuata solo un’analisi di tipo descrittivo, e non statistico.

I parametri che nel gruppo delle femmine hanno subito le variazioni maggiori sono sicuramente quelli relativi alla sfera sessuale, con un 100% di scomparsa dei segni di calore e dell'attività riproduttiva e una diminuzione del roaming per 4 soggetti su 5 (80%) in maniera assoluta, mentre in uno solo (20%) questo comportamento è aumentato. Inoltre è aumentata la ricerca del proprietario e delle carezze in tutte le gatte tranne nella femmina n°4 "Teresina", che invece addirittura rifugge il contatto con il suo padrone ed è più aggressiva verso lo stesso; nel medesimo soggetto è aumentata la diffidenza verso gli estranei, mentre al contrario in generale è molto aumentata la socievolezza. Per quanto riguarda l'assunzione di cibo, in un soggetto ha subito un forte incremento, in tre un aumento lieve e in una è diminuita lievemente. La quantità di cibo per pasto è aumentata lievemente nell'80% delle gatte, mentre in una si è modificata in senso negativo rispetto al periodo precedente l'impianto. Infine la frequenza di assunzione, che in due femmine è molto aumentata, in altre due è cresciuta solo in maniera lieve e in una è addirittura diminuita.

A proposito della frequenza di minzione e di defecazione abbiamo pochissimi dati, poiché la maggior parte dei soggetti sottoposti alla prova vive anche fuori casa, per cui il proprietario non è in grado di riferire eventuali variazioni. Nell'unico caso in cui la gatta usufruisce di una cassetta igienica, non ci sono stati mutamenti rispetto al periodo pre-impianto.

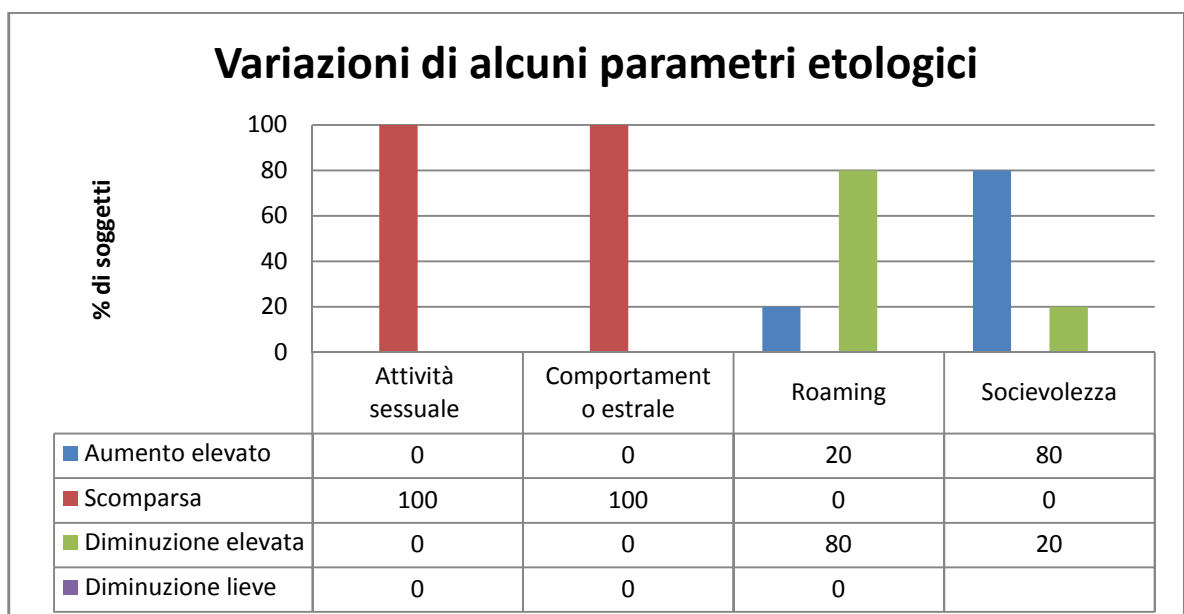


Grafico 3.5.1: Variazioni nell'ambito di alcuni parametri etologici nel gruppo di cinque gatte femmine (2-6 anni di età, peso medio 3,36 kg) trattate con l'analogo del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

	N°1 Azzurra	N°2 Jamie	N°3 Micia	N°4 Teresina	N°5 Nebbia
Assunzione alimento	+	+	++	+	-
Quantità alimento	+	+	+	+	-
Frequenza assunzione alimento	+	++	++	+	-
Frequenza minzione	NV	0	0	0	0
Frequenza defecazione	NV	0	0	0	0
Mostra segni di calore	--	--	--	--	--
Vagabondaggio	--	--	--	+	--
Attività sessuale	--	--	--	--	--
Aggressività verso i co-specifici	-	--	-	+	--
Si lascia maneggiare dal proprietario	++	++	++	-	++
Si lascia maneggiare/avvicinare da estranei	++	++	+	--	++
Aggressività verso l'uomo	--	--	NV	+	NV

Tab 3.5.1: Entità delle variazioni dei parametri etologici nelle cinque gatte (di età compresa tra 1,5 e 3 anni; peso medio 3,36 kg) trattati con un impianto contenente l'agonista del GnRH Deslorelin (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Legenda : + variazione del parametro in senso positivo
 - Variazione del parametro in senso negativo
 NV nessuna variazione
 0 nessun dato

Di seguito procediamo a riportare i risultati del modulo etologico singolarmente per ogni soggetto coinvolto nello studio.

Gatto n°1 "Azzurra": in questo soggetto la proprietaria riferisce una variazione lieve in senso positivo per quanto riguarda i parametri assunzione di cibo, frequenza di assunzione e quantità di cibo per pasto. La gatta in questione vive in casa con la possibilità di uscire, ma è stata abituata (e lo preferisce) ad utilizzare la cassetta, per cui possiamo sapere che non ci sono variazioni riguardo a frequenza di minzione o di defecazione, né altri sintomi riguardanti l'apparato

urinario. Durante il monitoraggio non ha mai mostrato segni di calore, tranne dopo lo stimolo con il GnRH al test n°1; le stimolazioni successive invece non hanno portato ad alcuna manifestazione estrale. L'aggressività verso i co-specifici, in questo caso verso gli altri gatti presenti in casa, è diminuita in modo lieve; infatti nelle situazioni di competizione, come ad esempio il momento della somministrazione del cibo, mantiene il comportamento di dominanza e "soffia" agli altri gatti per poter mangiare per prima. Al contrario con il proprietario e con gli estranei è molto più socievole e tranquilla (la proprietaria riferisce che è diventata più "ubbidiente" già dopo 30 giorni dall'impianto), e non dimostra alcuna aggressività verso l'uomo.

Gatto n°2 "Jamie": di questa femmina non ci è dato conoscere se ci sono state variazioni riguardo a minzione e defecazione, ma la proprietaria riferisce che non ha più manifestato sintomi di cistite, patologia alla quale questo soggetto era molto sensibile, soprattutto ai cambi di stagione. Riguardo all'assunzione di cibo, essa è lievemente aumentata, così come la quantità di cibo per pasto, mentre è molto aumentata la frequenza di assunzione (la gatta richiede insistentemente il cibo) già dopo il primo mese. Nella settimana dopo l'impianto la proprietaria riferisce di aver notato dei comportamenti simili a quelli dell'estro, ma già dopo un mese (25/11/2009) riporta anche che ad un maschio che ha tentato di annusarla la gatta ha dato una zampata. Non ci sono più stati segni di attività sessuale, e da 30 giorni dall'impianto il soggetto in questione ha manifestato una chiara preferenza per l'ambiente domestico, ed esce solo per qualche ora di passeggiata. La disponibilità al contatto sia con il proprietario che con gli estranei è molto aumentata, come è molto più incline a giocare con i propri figli senza manifestare alcun tipo di aggressività.

Gatto n°3 "Micia": il soggetto in questione è la femmina più anziana di tutto il suo gruppo, ed anche la prima arrivata in famiglia. Ha mantenuto una certa aggressività verso gli altri gatti con cui vive, ma spesso, più che ostilità fine a sé stessa, sembra essere una manifestazione di dominanza. Verso la proprietaria si dimostra molto più disponibile al gioco e alle carezze, e preferisce non allontanarsi da casa dal secondo mese di trattamento, mentre prima era un soggetto che spesso e volentieri si spostava. Dopo l'impianto non ha manifestato segni estrali evidenti, come non ha più attirato i maschi per tutto il periodo del monitoraggio. Non ci sono notizie su frequenza di minzione e defecazione. A proposito dell'alimentazione, già dopo 30 giorni dall'impianto ci viene riferito che ha incrementato l'assunzione di cibo e la frequenza di assunzione in maniera importante, mentre la quantità per pasto è sì aumentata, ma in maniera lieve.

Gatto n°4 “Teresina”: questa femmina ha manifestato dei comportamenti particolari rispetto agli altri soggetti del suo stesso gruppo. Dopo un mese dall’impianto i proprietari riferiscono che non gradisce più molto essere presa in braccio ed è insofferente anche alle carezze, e se può preferisce stare fuori casa. 60 giorni dopo la situazione non è migliorata: è aggressiva e sta molto via da casa; secondo la proprietaria “si è fatta adottare” dalla famiglia che vive nella casa accanto, e pare che con loro si dimostri più socievole. Dopo l’applicazione del Deslorelin l’aggressività che era già in parte presente verso il figlio maschio si è esasperata, tanto che sono costretti a tenerli in due ambienti separati quando sono entrambi dentro casa. Per quanto riguarda l’alimentazione, nel primo mese la quantità di cibo assunta è diminuita, per poi tornare normale ed infine aumentare in maniera lieve ma saltuaria; anche la frequenza di alimentazione e la quantità di cibo per pasto hanno subito un incremento lieve. Non sappiamo nulla a proposito di eventuali variazioni nella frequenza di minzione e/o defecazione. Purtroppo questo soggetto è stato vittima di un incidente stradale al 79° giorno di trattamento, per cui non si possono conoscere dati ulteriori.

Gatto n°5 “Nebbia”: da subito questa gatta ha manifestato modificazioni soprattutto nell’ambito dell’alimentazione. Soprattutto durante i primi due mesi di trattamento la capacità di ingestione è diminuita per poi aumentare di nuovo, ma sempre mantenendosi a livelli inferiori rispetto al periodo pre-trattamento; dal terzo mese in poi si è stabilizzata. Tre giorni dopo l’impianto ha manifestato segni compatibili con l’estro, dopodiché non ha più avuto alterazioni del comportamento né ha attirato maschi. Il roaming è estremamente diminuito già dopo 60 giorni, e nei mesi successivi la gatta ha dimostrato una netta preferenza per lo stare in casa e il dormire. Nello stesso periodo la proprietaria riferisce un rilevante aumento della socievolezza e della disponibilità a farsi toccare sia verso di lei che verso gli estranei. Riporta inoltre una diminuita aggressività verso i gatti che vivono nelle case confinanti.

4. DISCUSSIONE

Il nostro studio sul Deslorelin Acetato, somministrato ad una dose di 4,7 mg sotto forma di impianto sottocutaneo, ha determinato nei maschi una riduzione della concentrazione sierica del testosterone, e nella femmina una stabilizzazione della progesteronemia ai livelli basali tipici della fase di quiescenza sessuale. Il giorno di inizio dello studio i valori basali dell'androgeno sono risultati in tutti i soggetti entro il range fisiologico di 0,02-23,47 ng/ml (Johnstone et al, 1990), così come tutte le femmine lo stesso giorno presentavano valori di progesteronemia inferiori a 2,0 ng/ml (Johnston et al, 2001).

Il Deslorelin viene rilasciato in maniera continua dal veicolo lipidico e va così a scalzare il GnRH dai propri recettori, andando ad occuparli in maniera stabile, poiché possiede un'affinità di legame maggiore. Infatti è classificato come un super-agonista del GnRH, con una potenza forse 100 volte maggiore di quest'ultimo (Padula, 2005), oltre ad un'emivita plasmatica più lunga. La risposta alla somministrazione di questa sostanza consiste in una fase acuta in cui si ha aumento dell'LH e dell'FSH, ed una fase cronica con riduzione dei recettori per il GnRH nelle cellule gonadotrope (D'Occhio, 2002). Nel nostro caso non è stato possibile osservare questo tipo di reazione, poiché sia nel gruppo dei maschi che in quello delle femmine il primo prelievo post-impianto è stato effettuato a distanza di 30 giorni, mentre il suddetto aumento di LH si ha nelle prime 24 ore dopo la somministrazione, come verificato anche da uno studio condotto in Australia su tre gruppi di sei canguri maschi (*Macropus Eugenii*), ai quali è stato iniettato sottocute un impianto a base di Deslorelin rispettivamente da 5, 10 e 20 mg. In questa specie la somministrazione di questo principio attivo determina un incremento acuto, della durata di due ore, della concentrazione plasmatica di LH e testosterone. Livelli elevati di tale ormone permangono nel sangue per circa 24 ore per poi portarsi a livelli basali 7 giorni dopo l'impianto. Nel nostro lavoro la brusca variazione osservata nelle gatte del rapporto cellule cheratinizzate-non cheratinizzate che si è evidenziata dagli strisci vaginali prodotti 48 ore dopo l'impianto può ragionevolmente far pensare ad un aumento di LH e FSH (cioè quello che si ha nella fase acuta, pochi giorni dopo la somministrazione del Deslorelin, in cane, toro e cavallo), ma non è stato possibile verificarlo dal punto di vista sperimentale.

Segue poi la fase cronica, nella quale la produzione di LH e steroidi gonadici rimangono inalterate o diminuiscono a seconda della specie e della sensibilità dell'ipofisi al GnRH (Herbert et al, 2004). Una diminuzione della secrezione pulsatile di LH ed FSH, in femmine trattate cronicamente con

GnRH, risulta nell'arresto della crescita follicolare alla fase dipendente dalle gonadotropine e mancata ovulazione (D'Occhio et al, 2002). La soppressione dell'ipofisi anteriore può essere mantenuta per lungo tempo, purché il GnRH agonista sia presente in circolo ad una concentrazione soglia.

La ditta produttrice (Virbac Animal Health) dichiara per l'impianto da noi utilizzato un tempo di 8-14 giorni per il raggiungimento della concentrazione sierica minima dello steroide (pari a 1 ng/ml) nel cane. Uno studio condotto in Australia su 4 cani maschi trattati con impianto da 6 mg ha rilevato che il testosterone scende sotto valori non determinabili tra il 21° e il 27° giorno post-trattamento (Junaidi et al, 2003). Un ulteriore studio condotto su 16 cani maschi impiantati con 3, 6 e 12 mg di Deslorelin ha evidenziato che il valore di testosterone non rilevabile è raggiunto nel periodo compreso tra 6 e 32 giorni (Trigg et al, 2001).

Il Deslorelin è stato utilizzato anche per tentare di controllare le nascite e l'aggressività di alcuni felidi selvatici in Sud Africa : sono state trattate con impianti da 6 mg un leopardo, 8 ghepardi e 6 licaoni femmina, e con impianti da 12 mg due leonesse, con il risultato che nessuna è rimasta gravida e le leonesse e i ghepardi sono ritornate in calore rispettivamente 18 e 12 mesi dopo l'impianto, a testimonianza che l'effetto è reversibile. Sono stati somministrati impianti da 6 mg anche ad un licaone e a 4 ghepardi maschi: un mese dopo il trattamento la concentrazione plasmatica dei licaoni era a livelli basali, e si è mantenuta tale per un anno. Lo stesso tipo di studio è stato effettuato anche negli USA, impiantando con 6 mg di Deslorelin 7 lupi rossi e 5 lupi grigi, tutti maschi, sui quali non è stato rilevato alcun effetto sulla spermatogenesi né sul comportamento sessuale. È stato trattato anche un gatto selvatico (*Felis Nigripes*), che ha risposto ad una somministrazione di un impianto da 3 mg con diminuzione della spermatogenesi, della libido e dell'aggressività; inoltre nello stesso soggetto le spicole non erano più osservabili a 3 mesi dal trattamento, ma erano di nuovo presenti dopo 4-6 mesi (Bertschinger et al, 2001). Nel nostro studio risulta difficile determinare il momento preciso in cui si è avuta la completa down regulation, poiché il primo prelievo è stato effettuato a distanza di 30 giorni dall'impianto, quando già la concentrazione sierica del testosterone era al di sotto del valore 0,1 ng/ml in tutti i soggetti (tranne in quello in cui l'impianto sembra non aver funzionato in maniera adeguata), e si è poi mantenuto tale per tutta la durata del monitoraggio, che è variata da 8 a 14 mesi massimo.

I test di stimolo effettuati con il GnRH non hanno determinato alcun aumento del testosterone circolante, cosa che avrebbe dovuto accadere se l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare fosse stato

intatto. Per questo motivo possiamo dire che il principio attivo è stato efficace nel sopprimere la produzione di testosterone: infatti quello che si evidenzia dall'analisi statistica è che c'è una differenza di significatività ($P < 0,001$) tra i test n°1 e n°2 e n°1 e n°3, ma non tra il secondo e terzo test: ciò significa che rispetto al valore di testosteronemia post-GnRH al momento dell'impianto (test n°1=giorno 0), la concentrazione rilevata al giorno 90 e 180 è significativamente diversa, ma non c'è variazione significativa tra il tempo 90 e il tempo 180. Inoltre la differenza tra valore pre e post stimolo al test n° 1 è anch'essa significativa ($P < 0,001$): da ciò si deduce che c'è una reale differenza tra il valore pre e post stimolo, che non può essere dovuta al caso. L'analisi statistica rivela anche che c'è una differenza e una diminuzione statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra i valori medi di testosteronemia basale come confermato dagli indici di correlazione di Pearson, che indicano una correlazione significativamente negativa ($P < 0,001$) tra il valore di testosterone basale e i giorni di monitoraggio: la concentrazione sierica di base dell'ormone diminuisce in maniera rilevante con il passare dei giorni. Tutto ciò porta a pensare che il numero dei recettori per il GnRH a livello ipofisario sia diminuito nei mesi o che tali recettori siano stati desensibilizzati all'azione del fattore di rilascio. I risultati riguardanti la testosteronemia di questo nostro lavoro sono compatibili con quanto osservato in precedenza da Zoppi (2005).

Uno studio condotto in Canada su cani maschi adulti trattati con un agonista del GnRH (D-Trp6-GnRH ethylamide) rileva una riduzione del diametro scrotale del 64% dopo 4 mesi di trattamento (Dube et al, 1987), mentre 4 cani trattati con impianti da 6 mg di Deslorelin hanno subito una diminuzione del volume testicolare del 35% a distanza di 14 settimane dall'impianto (Junaidi et al, 2003). Al contrario, in un lavoro nel quale sono stati trattati 3 gruppi di maschi di wallaby non si sono riscontrate differenze statisticamente significative della lunghezza o del diametro testicolare ($P > 0,05$) (Herbert et al, 2004). Anche l'impianto da 3 mg in un gatto selvatico maschio nello studio di Bertschinger sopra citato ha prodotto come risultato una diminuzione significativa delle dimensioni testicolari. In uno studio condotto su gatti domestici ai quali sono stati somministrati antigeni che provocano la produzione di anticorpi anti-GnRH endogeno a scopo anticoncezionale, si è ottenuta l'atrofia dei testicoli ($P < 0,001$) dopo tre mesi dal trattamento (Levy et al, 2004). Da un altro lavoro su 19 gatti domestici trattati con un impianto da 4,7 mg di Deslorelin, non sono state rilevate differenze significative per quanto riguarda lunghezza, diametro e volume dei testicoli (Zoppi, 2005). Quest'ultimo studio in particolare è in totale disaccordo con quanto invece osservato da noi, dato che secondo i dati che abbiamo raccolto esiste invece una significatività nelle differenze tra le varie misurazioni. Quello che

cl clinicamente si può notare è che la tendenza sia della lunghezza che del diametro di entrambe le gonadi è di diminuire proporzionalmente al calo del testosterone: tale ipotesi è poi supportata dall'evidenza statistica del fatto che se è negativa la correlazione tra testosteronemia e giorni di monitoraggio, e negativa anche quella tra giorni di monitoraggio e tutte le dimensioni testicolari, allora sarà vero che al calo dell'ormone nel tempo corrisponde una significativa diminuzione dei testicoli. È anche vero però che in realtà la correlazione stretta tra il valore in questione e le dimensioni testicolari è positiva: questo è probabilmente legato al fatto che le misure toccano un valore minimo (in media a 140 giorni) per poi ricominciare ad aumentare, nonostante la concentrazione periferica dell'ormone non risalga ma anzi si mantenga invariata anche ai test successivi al di sotto dello 0,1 ng/ml. Si ipotizza quindi che a livello testicolare esista un qualche fattore che induce l'aumento di dimensioni, e sarebbero utili ulteriori studi in questo senso, magari accompagnati dall'esame istologico del tessuto testicolare dei soggetti trattati. Oltre a tutto ciò, rimane da dire che le misure sono correlate in maniera estremamente significativa anche tra di loro: ciò implica che, diversamente da quanto osservato da Zoppi (2005), la lunghezza ed il diametro diminuiscono rimanendo proporzionate tra loro in entrambi i testicoli.

Un carattere secondario fortemente legato alla concentrazione del testosterone è la presenza delle caratteristiche spicole cornee peniene. L'utilizzo di 3 mg di Deslorelin in un gatto selvatico americano ne ha prodotto la scomparsa, iniziata a 30 giorni dall'impianto e terminata dopo tre mesi, così come le ha fatte regredire entro sei mesi l'uso di impianti da 4,7 mg in gatti domestici (Zoppi, 2005). Il risultato del nostro studio rispetto a questo parametro ci permette di affermare che con l'applicazione del Deslorelin si ottiene un effetto del tutto comparabile con quello della classica orchietomia, che determina la regressione delle strutture in questione in sei settimane. Infatti i dati da noi ricavati evidenziano che già a 60 giorni le spicole o sono scomparse del tutto oppure sono in fase di avanzata regressione per scomparire totalmente entro il sesto mese nel soggetto nel quale permangono più a lungo. Secondo gli Indici di Correlazione di Pearson c'è una correlazione negativa piuttosto forte tra la presenza delle spicole e sia l'età dei soggetti, che il valore di testosteronemia (rispettivamente $P=0,003$ e $P=0,001$): questi dati ci permettono di affermare che durante il monitoraggio, ad una diminuzione della concentrazione di testosterone si è accompagnata una scomparsa delle spicole e che essendo meno presenti nei soggetti più giovani, in questi probabilmente sono scomparse anche più facilmente. Inoltre esiste l'evidenza di un'ulteriore correlazione negativa molto forte pure tra la presenza di spicole e la lunghezza ed il diametro dei testicoli, cioè alla scomparsa delle papille è associata la diminuzione delle

dimensioni di entrambe le gonadi. È presente invece una correlazione positiva (sempre significativa) tra il parametro e i giorni e le classi di monitoraggio (tab. 3.1.7), dovuta al fatto che a presenza, regressione ed assenza delle spicole sono stati assegnati rispettivamente i valori di 1, 3 e 2; logicamente avendo attribuito valori crescenti al parametro, la correlazione in questione è per forza positiva, ma è da interpretare come se fosse negativa, ed infatti le spicole regrediscono fino alla scomparsa con il passare del tempo nella maggioranza dei soggetti.

Dall'esame autoptico di un soggetto maschio precocemente deceduto, è risultato che nel sottocute del sito di impianto non è presente alcuna reazione macroscopicamente visibile, come accade nel cane (Trigg et al, 2006), mentre all'istologico il tessuto presenta un certo grado di reazione, ma avendo potuto effettuare tale indagine in un solo maschio, non possiamo affermare nulla; bisognerebbe studiare più approfonditamente il grado di reazione, tenendo anche conto che il gatto di per sé è più sensibile alle manualità che prevedono iniezioni (tratto da Ettinger, 1995).

Il Deslorelin Acetato è stato da noi utilizzato anche a scopo di verificare l'efficacia nel ridurre l'aggressività tipica dei gatti maschi interi. Un impianto da 6 mg è stato applicato a tre lontre d'oceano (*Enhydra lutris*), le quali dopo 24 mesi presentavano ancora livelli sierici di testosterone bassi e un carattere docile, nonché testicoli di dimensioni ridotte (Bertschinger et al, 2001). Anche nel gatto selvatico trattato con 3 mg di principio attivo l'aggressività si è ridotta. Questa metodica è utilizzata con successo anche per diminuire l'aggressività dei cani maschi. Nel gatto domestico studi precedenti (Zoppi, 2005) hanno dimostrato che l'impianto da 4,7 mg conduce ad una diminuzione dell'aggressività verso i co-specifici (75%) ed alla diminuzione della necessità di marcare il territorio (62,5%). Nel nostro caso i risultati ottenuti ci permettono di dire che per quanto riguarda l'aggressività il trattamento ha avuto efficacia nella quasi totalità dei soggetti, fatta eccezione per Felix, azzerando i conflitti e rendendo i gatti molto più sedentari. Nell'85,7% dei maschi è scomparsa la volontà di vagabondare, e negli stessi maschi non solo è completamente scomparso il comportamento di marcatura, ma anche l'odore sgradevole dell'urina: ciò conferma il ruolo del testosterone in questa caratteristica sessuale secondaria. Anche l'attività riproduttiva ha subito un'interruzione, sempre eccezion fatta per il soggetto "Felix". I tre parametri "aggressività", "marcatura" ed "esplorazione" che Hart nel suo studio (1991) dichiarava non essere correlati, sembrano non esserlo anche nel nostro lavoro, come non lo erano in quello di Zoppi (2005). Anche quest'ultimo ha riportato il caso di un gatto che non ha presentato alcuna miglioria dal punto di vista etologico: il soggetto in questione era un animale

dall'indole selvatica, schivo e sempre vigile, molto simile al nostro "Felix", che però per giunta era anche un maschio dominante. Il fatto che il Deslorelin non abbia avuto efficacia nel caso di gatti di questo genere seguirebbe la teoria di Hart secondo cui la castrazione di un soggetto dominante può non provocare alcuna modificazione del comportamento.

Un altro cambiamento molto significativo riguarda l'assunzione del cibo, che dal nostro lavoro risulta essere aumentata in maniera molto elevata nell'85% dei soggetti soprattutto nei primi tre mesi di trattamento, accompagnata da un incremento molto elevato (nel 43% dei maschi) e lieve (nel 57%) della quantità di alimento per pasto e da una propensione marcata nel 71% dei soggetti ad aumentare la frequenza dei pasti. I risultati appena enunciati sono in accordo con il lavoro precedente di Zoppi (2005) nel gatto maschio e con il lavoro di Kankuc (2001).

Se andiamo ad osservare l'aumento di peso nel maschio, noteremo che è decisamente rilevante. Tale aumento è maggiore nei primi tre mesi di trattamento, il che concorda con i dati presenti in letteratura sulla castrazione chirurgica (Fettman et al, 1997). Diversamente da quanto riscontrato nel 2005 da Zoppi però, dal nostro lavoro risulta una differenza significativa tra i vari pesi nelle diverse classi di monitoraggio, il che ci porta a dire che anche con il Deslorelin c'è un rischio di obesità simile a quello dell'orchietomia. Sicuramente in entrambi i casi l'aumento di peso non è dovuto solo alla pratica di per sé, che però ovviamente diminuendo la concentrazione di testosterone si rende responsabile di un calo del metabolismo basale fino al 30% (Belsito et al, 2008), dato che il testosterone è un anabolizzante muscolare poiché stimola la sintesi proteica, la divisione cellulare e soprattutto riduce il numero di adipociti (Aggugini et al, 1998a), ma anche alla modificazione delle abitudini alimentari e alla diminuzione dell'attività fisica che pratica. In effetti anche nel nostro studio, come in quelli precedenti, gli animali che sono aumentati più di peso sono quelli che sono diventati più sedentari e contemporaneamente hanno aumentato l'ingestione.

Si segnala infine l'acutizzazione del miagolio nei soggetti Momi e Ugo, ascrivibile al coinvolgimento del testosterone anche nella regolazione del tono della voce; un evento del genere era già stato segnalato nel lavoro di Zoppi del 2005.

Il Deslorelin è stato applicato nelle femmine di diverse specie, come precedentemente già accennato. Oltre ai felini selvatici, la letteratura riferisce di un largo uso nella cagna, sia per indurre l'estro (Kutzler, 2007), che per il controllo della riproduzione (Trigg et al, 2001 e 2006; Gobello, 2006; Romagnoli et al, 2009). Questo farmaco è stato inizialmente sviluppato e

commercializzato in Australia, come impianto sottocutaneo per indurre l'ovulazione nelle cavalle; inoltre è stato usato anche nella bovina (D'Occhio et al, 2002). Nel tricosuro o opossum volpino (*Trichosurus vulpecula*) un impianto a lento rilascio di Deslorelin (a basso dosaggio 4.7 mg o alto dosaggio 9.4 mg), secondo lo studio di Eymann e colleghi del 2007, crea un effetto acuto a livello della ghiandola pituitaria simile tra i due sessi, e cioè l'aumento transitorio nella concentrazione di LH nelle prime ore dall'impianto. Nelle femmine questo è stato associato in alcuni individui con l'interruzione del normale ciclo estrale e riproduttivo per 2-10 giorni. Tre settimane dopo il trattamento le femmine entrano in anestro e rimangono infertili per almeno una stagione riproduttiva. L'effetto del trattamento è reversibile se l'impianto viene rimosso, ma il tempo necessario perché tornino attive dal punto di vista riproduttivo è variabile. Nella gatta domestica infine il principio attivo è stato utilizzato come nella cagna per l'induzione dell'estro (Kutzler, 2007) ma anche per la soppressione dell'estro a lungo termine. In uno studio condotto su 20 femmine, a dieci di queste è stato somministrato un impianto da 6 mg di Deslorelin: inizialmente il trattamento ha stimolato il rilascio di estradiolo e il comportamento estrale, poi c'è stata effettivamente la soppressione dell'attività ovarica (comprovata dall'assenza di calori e dal dosaggio di estradiolo inferiore a 20 pg/ml). Dopo 14 mesi due gatte sono ritornate ad un'attività ciclica normale, in due sono stati osservati piccoli picchi irregolari di estrogeni, e sei non hanno manifestato alcuna ciclicità (Munson et al, 2001).

In un lavoro più recente invece, un gruppo di 14 gatte è stato trattato con un impianto da 9,5 mg di Deslorelin, ed anche in questo caso all'impianto è seguito un incremento dell'estradiolo fecale con conseguente estro. Nonostante alle gatte sia stato permesso di accoppiarsi, non ne è derivata alcuna gravidanza. Le femmine impiantate non hanno manifestato segni di estro durante il periodo dello studio, dimostrando che il principio attivo è efficace nel controllo della fertilità per 18 mesi nella gatta (Toydemir et al, 2008). I risultati che hanno riportato questi due studi sono del tutto in accordo con quelli che abbiamo ricavato dal nostro lavoro. Infatti anche il gruppo di femmine da noi trattato con un singolo impianto da 4,7 mg di Deslorelin ha manifestato comportamenti riconducibili all'estro nella settimana seguente l'impianto, con un picco di frequenza nelle 48 ore seguenti; l'ipotesi che tali manifestazioni siano legate ad un picco di LH conseguente all'impianto è ancora più plausibile se pensiamo al repentino cambiamento che si è avuto nel rapporto tra cellule cheratinizzate e non dal giorno dell'impianto allo striscio effettuato 48 ore dopo. Inoltre, grazie ai dati ottenuti tramite il dosaggio del progesterone e i moduli etologici, possiamo affermare che tutte le femmine da noi trattate hanno interrotto

l'attività sessuale per almeno 8 mesi: infatti il valore di progesteronemia si è sempre mantenuto a valori inferiori a 2,0 ng/ml e ai diversi test, nonostante sembri esserci un aumento della concentrazione sierica dell'ormone tra i due momenti di dosaggio, la differenza non è significativa dal punto di vista statistico.

I risultati della citologia vaginale durante tutto l'arco del monitoraggio sono pienamente compatibili con quanto riportato in letteratura a proposito della percentuale di cellule cheratinizzate e non che dovrebbero essere presenti nella fase di quiescenza dell'apparato genitale.

Anche nel gruppo delle femmine è stata da noi rilevata una tendenza clinica all'aumento di peso, che però non si è rivelata essere significativa. Negli studi precedenti a proposito dell'applicazione del Deslorelin nella gatta domestica questo parametro non è mai stato monitorato, per cui non è possibile fare confronti. L'esito del nostro lavoro è però in contrasto con la nota tendenza all'aumento di peso anche nelle femmine dopo sterilizzazione; quindi sarebbero opportuni ulteriori studi in questo senso, per valutare se effettivamente il principio attivo non possa influire sull'incremento ponderale.

Da segnalare sicuramente l'aumento dell'aggressività dopo l'impianto nel soggetto "Teresina": nei lavori anteriori al nostro non viene mai riportata quest'evenienza, per cui anche in questo caso sono necessari ulteriori dati per capire se il nostro risultato è dovuto al caso oppure è possibile che in un soggetto già tendente all'aggressivo il trattamento con Deslorelin invece di diminuire il parametro lo possa esacerbare. Ciò sarebbe peraltro compatibile con quanto reso da studi sulla sterilizzazione in soggetti aggressivi, maschi e femmine, che afferma che non sempre l'ovarectomia o l'orchiectomia sono sistemi efficaci nel combattere il comportamento aggressivo.

Abbiamo infine deciso di trattare in maniera leggermente più approfondita il caso specifico di Felix, poiché i valori ottenuti non rispettano l'andamento della testosteronemia post-impianto della media dei soggetti, né il maschio in questione ha riportato modificazioni ai caratteri secondari o del comportamento. In questo gatto l'impianto sembra aver funzionato solo in modo parziale, poiché comunque nei primi sei mesi, nonostante ai test rispondesse sempre mantenendo il picco di testosterone, la testosteronemia segue una curva lentamente decrescente fino ai 120 giorni (anche se al test n°2=90 giorni dall'impianto comunque il livello di testosterone dal valore basale di 0,371 ng/ml passa a 9,63 ng/ml): alla fine del 4° mese il valore risulta essere inferiore a 0,1 ng/ml. Al test successivo però da 0,12 ng/ml lo stimolo fa salire la

concentrazione ormonale a 7.71, dimostrando che il Deslorelin non è stato efficace o perlomeno è riuscito solo a diminuire parzialmente la concentrazione sierica di testosterone, ma non a sopprimere l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare. L'andamento dei valori della testosteronemia di questo gatto presenta dei picchi e non sembra seguire una tendenza dopo i 120 giorni.

Per quanto riguarda la sfera comportamentale, ciò che possiamo dire è che nei primi mesi di trattamento l'impianto sembra essere efficace: il soggetto ha diminuito il roaming, nonostante non rinunci a marcare il territorio e l'urina abbia ancora un odore sgradevole. Con il sopraggiungere dell'inverno però i comportamenti tipici del maschio si sono ripresentati, Felix ha difeso il suo territorio, ha continuato a marcare fortemente e ha ripreso a vagabondare. Nel periodo di gennaio-febbraio-marzo rimane spesso via di casa, e quando torna presenta segni di lotta. Mostra decisamente meno interesse per il cibo (infatti dimagrisce, come tutti i maschi all'inizio della "stagione degli amori"). Le dimensioni testicolari presentano anch'esse una diminuzione nei primi 4 mesi come la testosteronemia, e parimenti a questa al 120° giorno le gonadi raggiungono la grandezza minima; dopo questo momento riprendono a crescere per tornare infine a com'erano prima dell'impianto. Le spicole cornee del pene non sono mai scomparse. È presumibile che in questo soggetto il Deslorelin abbia avuto un effetto solo minimo. Le cause di questo insuccesso potrebbero essere da ricercare in una scorretta applicazione dell'impianto, nel fatto che l'impianto fosse difettato, oppure, ipotesi più plausibile, nel fatto che il gatto in questione era un soggetto dominante e quindi con una testosteronemia più elevata: il dosaggio di 4,7 mg di principio attivo potrebbe essere stato insufficiente a sopprimere l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade e la produzione di testosterone, con la conseguente permanenza dei caratteri sessuali secondari. È infatti interessante notare come le dimensioni dei testicoli in questo maschio siano già in partenza notevolmente superiori a quelle degli altri soggetti del nostro studio e al valore medio nel gatto (che è 15 x 10 mm), e si mantengano comunque più elevate durante il monitoraggio. L'analisi dei dati effettuata in proposito evidenzia come tutte le misure di entrambi i testicoli di Felix siano significativamente diverse ($P = 0,001$) da quelle degli altri maschi sia nel giorno di impianto, che nei controlli successivi per tutto il monitoraggio ($P = 0,008$). È significativa anche la differenza tra i volumi delle gonadi sia tra Felix e gli altri maschi (per il volume del testicolo destro $P=0.004$, per il volume del sinistro $P<0,001$), che tra le diverse classi di monitoraggio (rispettivamente per il volume del testicolo destro $P=0,015$, e per il sinistro $P=0,018$).

È possibile quindi che in questo tipo di animali sia necessario aumentare il dosaggio del principio attivo, ed ulteriori studi sono indispensabili per garantire una sicurezza d'impiego.

5. CONCLUSIONI

Il prodotto da noi utilizzato, un impianto a base di Deslorelin Acetato in veicolo lipidico al dosaggio di 4.7 mg (Suprelorin®, Virbac Animal Health), si è rivelato essere efficace nel controllo della riproduzione del felino adulto, sia esso maschio o femmina, di pesi ed età diverse. Tale impianto ha effetto reversibile, e al momento non sono note controindicazioni. L'applicazione del Deslorelin non comporta alcuna difficoltà pratica né è dolorosa per l'animale (non è stata infatti necessaria la sedazione). In seguito alla manualità non si presentano reazioni macroscopiche nel sito di impianto, mentre all'istologico sembra esserci un certo grado di reazione al corpo estremo.

L'esito finale del nostro studio ci permette di affermare che tale principio attivo, somministrato con modalità a lento rilascio per via sottocutanea, comporta la soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade nel gatto domestico maschio per un periodo di almeno 8 mesi e fino ad un massimo di 14 mesi (sulla base dei dati da noi raccolti, ma è probabile che l'effetto perduri), accompagnata da un significativo calo del testosterone a livelli $< 0,1$ ng/ml ($P < 0,05$). Nella femmina risulta la soppressione del ciclo per un periodo di almeno 240 giorni, con il mantenimento della progesteronemia a valori molto $< 2,0$ ng/ml, e la citologia vaginale conferma lo stato di anestro, con la marcata assenza di cellule cheratinizzate. La durata dell'efficacia tuttavia può variare individualmente, soprattutto nella femmina (Munson et al, 2004).

I caratteri sessuali secondari del maschio legati al testosterone subiscono una significativa riduzione: infatti se il principio attivo agisce con efficacia, le caratteristiche spicole peniene risultano in media definitivamente scomparse a 90 giorni ($P=0,01$), e la lunghezza, il diametro ed il volume testicolare diminuiscono sensibilmente in relazione al calo dell'ormone ($P < 0,001$). Tali variazioni si mantengono per tutta la durata dello studio.

Nell'unico soggetto per cui è stato possibile effettuare l'esame istologico dei testicoli, il referto riporta che i tubuli seminiferi sono di dimensioni costanti ed è presente edema diffuso. Sono invece assenti spermatociti maturi nel lume dei tubuli e dell'epididimo. Un solo soggetto non è però significativo per trarre delle conclusioni.

L'impianto non è stato sufficientemente attivo in un solo soggetto maschio, nel quale non solo non si è avuta la soppressione della produzione di testosterone, ma nemmeno variazioni significative del comportamento o dei caratteri secondari.

L'impianto di Deslorelin è un dispositivo che influisce anche sulla sfera comportamentale, con una marcata riduzione dell'aggressività in tutti i soggetti maschi (eccetto Felix) e nelle femmine (eccetto Teresina), con una riduzione significativa del roaming in entrambi i sessi, nonché scomparsa del comportamento di marcatura e dell'odore sgradevole dell'urina. Le femmine non hanno manifestato segni estrali per tutta la durata del monitoraggio.

L'appetito viene notevolmente influenzato dall'applicazione dell'impianto nel gatto maschio: si è osservato aumento dell'ingestione (elevato nell'85,7% dei soggetti), della quantità di cibo per pasto (molto elevato nel 43% e lieve nel 57% dei maschi) e della frequenza di assunzione (71%). Da ciò deriva un significativo incremento ponderale ($P < 0,001$). Al contrario, nella femmina non si verifica quest'eventualità.

Le stimolazioni pre-impianto con 50 µg di Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet) hanno dimostrato di poter indurre, dopo l'iniezione endovenosa, un aumento significativo ($P < 0,05$) della concentrazione sierica del testosterone, mentre i test effettuati a 90 e 180 giorni dall'impianto non hanno provocato nessuna risposta ormonale, né alcuna differenza significativa; ciò a riprova del fatto che i recettori del GnRH sono stati desensibilizzati.

In ultimo possiamo affermare che il Deslorelin si è rivelato un principio attivo potenzialmente utile nella clinica dei piccoli animali, poiché esso permette:

- di sopprimere la produzione di testosterone
- di sopprimere l'estro e le manifestazioni ad esso connesse, e di conseguenza di scongiurare il pericolo di gravidanze indesiderate
- di ridurre l'aggressività dei soggetti e quindi di evitare la trasmissione di patologie debilitanti quali FIV e FeLV
- di ridurre la marcatura del territorio e l'odore sgradevole dell'urina

L'agonista del GnRH Deslorelin Acetato potrebbe quindi essere utilizzato nel gatto quale alternativa alla sterilizzazione chirurgica, sia nel maschio che nella femmina, per quei proprietari che non vogliono alterare l'anatomia del proprio animale (gli allevatori ad esempio), ma che

comunque desiderino un blocco reversibile dell'attività sessuale. In aggiunta nel maschio si ottiene l'ulteriore pregevole effetto della scomparsa dell'odore sgradevole dell'urina.

Potrebbe anche essere utilizzato per ridurre le liti all'interno di piccoli gruppi di soggetti che magari vivono in ambienti ristretti, o per poter tranquillamente lasciare convivere maschi e femmine nello stesso ambiente senza temere conseguenze indesiderate.

Resta da verificare quale sia il motivo per cui nel nostro soggetto "Felix" l'impianto il Deslorelin non abbia avuto l'efficacia desiderata, ed in questo senso sono auspicabili ulteriori studi.

Sezione 6 "Allegati"

ALLEGATO °1: CITOLOGIA VAGINALE nella GATTA

Di seguito verranno riportati degli esempi di aspetto al microscopio ottico di uno striscio vaginale di gatta, tratto dalla documentazione fotografica prodotta durante l'arco della sperimentazione.

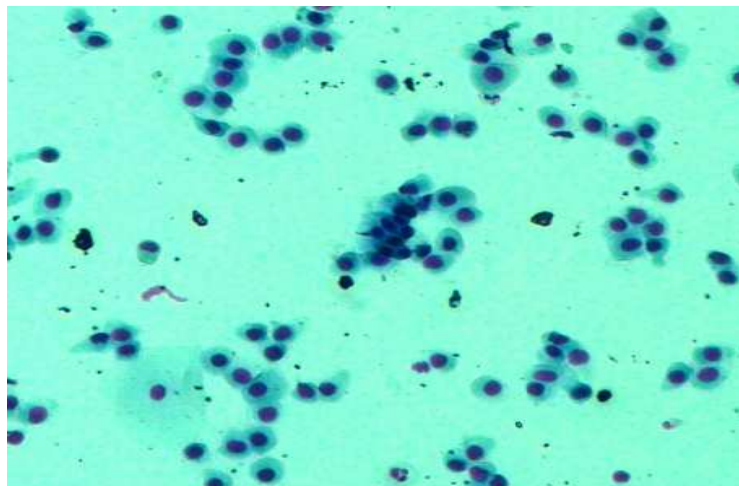


Immagine 6.1.1: Particolare di uno striscio vaginale in una gatta di razza Europea il giorno dell'impianto con l'analogo del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

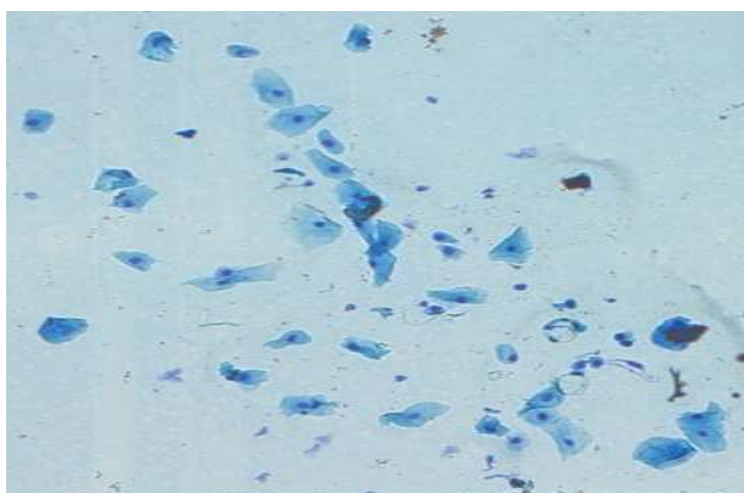


Immagine 6.1.2: Particolare di uno striscio vaginale in una gatta di razza Europea 48 ore dopo l'inizio del trattamento con l'analogo del GnRH Deslorelin Acetato in forma di impianto sottocutaneo (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

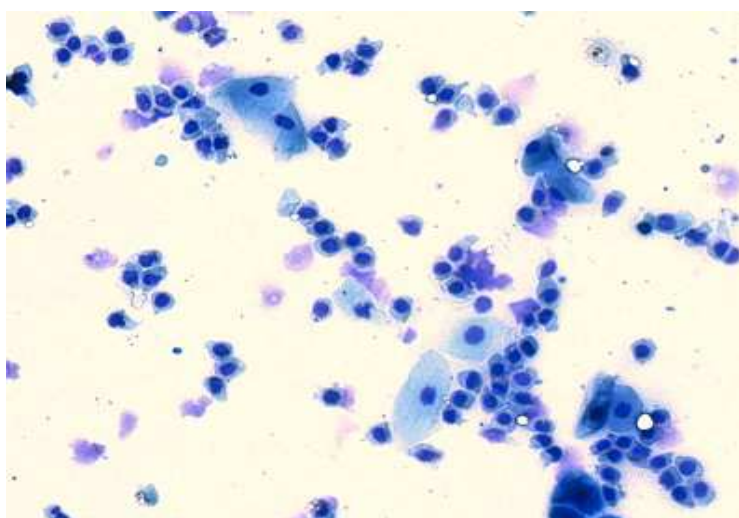


Immagine 6.1.3: Particolare di uno striscio vaginale in una gatta di razza Europea dopo 8 mesi di trattamento con l'analogo del GnRH Deslorelin Acetato (Suprelorin®, Virbac Animal Health).

Allegato n°2: MODULO ETOLOGICO PER LE FEMMINE

Nome: _____ Sesso F Età: _____

Data impianto: _____ Peso: _____

Mese di riferimento: _____

	per niente*	di meno*	come prima*	di più*	non sa*
<u>ALIMENTAZIONE</u>					
Assunzione alimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quantità alimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frequenza assunzione alimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>FUNZIONI FISILOGICHE</u>					
Frequenza minzione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frequenza defecazione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>COMPORAMENTO SESSUALE</u>					
Mostra segni di calore	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Attività sessuale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>COMPORAMENTO VERSO</u>					
<u>I COSPECIFICI</u>					
Aggressività verso i co-specifici	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Interazione con altre femmine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Interazione con maschi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>COMPORAMENTO VERSO</u>					
<u>L'UOMO</u>					
Si lascia maneggiare dal proprietario	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si lascia avvicinare da estranei	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si lascia maneggiare da estranei	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aggressività verso l'uomo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Note particolari:

* rispetto al mese precedente

ALLEGATO N°3: MODULO ETOLOGICO PER I MASCHI

Nome: _____

Sesso M

Età: _____

Data impianto: _____

Peso: _____

Mese di riferimento: _____

	per niente*	di meno*	come prima*	di più*	non sa*
<u>ALIMENTAZIONE</u>					
Assunzione alimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Quantità alimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frequenza assunzione alimento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>FUNZIONI FISILOGICHE</u>					
Frequenza minzione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frequenza defecazione	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>COMPORTEMENTO SESSUALE</u>					
Marcatura del territorio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Vagabondaggio	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Attività sessuale	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>COMPORTEMENTO VERSO I COSPECIFICI</u>					
Aggressività verso i co-specifici	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Interazione con altri maschi	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Interazione con femmine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<u>COMPORTEMENTO VERSO L'UOMO</u>					
Si lascia maneggiare dal proprietario	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si lascia avvicinare da estranei	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Si lascia maneggiare da estranei	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Aggressività verso l'uomo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Note particolari: _____

* rispetto al mese precedente

ALLEGATO N°4: REFERTO AUTOPTICO ED ISTOLOGICO DEL GATTO "BIRBA"

**Servizio diagnostico di Patologia e Anatomia
Patologica**

Dipartimento di Sanità Pubblica,
Patologia Comparata e Igiene Veterinaria
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli studi di Padova - Viale dell'Università, 16 -
35020 Legnaro (PD)
email: anatpat@unipd.it - telefono +39 049 8272507 - fax +39 049 8272602

Legnaro, 24/02/2009
alla cortese attenzione
prof. Stefano Romagnoli
Dipartimento Scienze Cliniche
Veterinarie
Viale dell'Università, 16
35020 Legnaro (PD)

Referto: **21316 / 2009**

Proprietario

Sig.ra Nicla Geretto

Paziente	Specie	Razza	Sesso	Età
ND	gatto comune	europeo	M	10m

Campioni Esami

1. animale intero Necropsia su piccolo animale

Descrizione:

ESAME MACROSCOPICO

Data decesso: 04/02/2009

Stato di conservazione: discreto

Modalità di conservazione: temp. ambiente

Stato di nutrizione: buono

Peso: 4 kg

APPARATO TEGUMENTARIO

Ritrovato impianto ormonale nei tessuti sottocutanei della groppa, circa 5 cm dallo spazio interscapolare, in posizione para-mediana destra. Nessuna reazione macroscopicamente evidente intorno all'impianto.

CUORE: (peso del cuore 16.2g, peso relativo 0,4%; rapporto parete libera ventricolo destro:sinistro 1:6) marcato sfiancamento del ventricolo destro con ipertrofia del ventricolo sinistro.

FEGATO: (peso dell'organo 142g; peso relativo del fegato 3,55%) minima colorazione oca diffusa.

MILZA: 10.4g

APPARATO MUSCOLO-SCHELETRICO: l'animale presentava cranio fratturato in seguito ad evento traumatico con lacerazioni cutanee e parziale fuoriuscita del materiale cerebrale.

ESAME MICROSCOPICO

CUTE E SOTTOCUTE: nello spessore del pannicolo adiposo sottocutaneo, al di sotto del derma, si rileva area circolare contenente frammenti di materiale esogeno amorfo, delimitato da una reazione fibroblastica di minimo spessore (1), diffusamente e gravemente infiltrato da macrofagi (3) e da una minima popolazione di linfociti (1) e fibroblasti (1) disseminati. Marcata neovascolarizzazione (3). Minimo edema e congestione della parete.

FEGATO: epatosi centrolobulare e periportale moderata diffusa associata a marcata congestione e rave iperemia diffusa dell'organo. Epatite linfocitaria lieve negli spazi portalì.

RENE: occasionali mineralizzazioni tubulari.

MILZA: prominenza delle strutture muscolari. Deplezione ematica e deplezione centrofollicolare nella sostanza bianca.

TESTICOLI: tubuli seminiferi di dimensioni costanti con edema diffuso. Assenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli e dell'epididimo.

Diagnosi:

DIAGNOSI MORFOLOGICA:

- *Pannicolite granulomatosa focale lieve delimitante l'impianto sottocutaneo.*
- Epatosi perivascolare diffusa moderata con epatite reattiva cronica aspecifica.
- Minime mineralizzazioni intratubulari renali.
- Deplezione splenica ematica e linfoide moderate.
- Assenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi e dell'epididimo.
- Trauma cranico con emorragie.

Il decesso è dovuto al grave trauma cranico con frattura della scatola cranica.

Commento:

Valutazione impianto sottocutaneo secondo norme ISO 10993-6:

Subtotale infiammazione 10 + subtotale altro 4 = totale della reazione all'impianto 14.

Non avendo un controllo negativo è impossibile fornire una valutazione comparativa e quindi il grado di irritazione.

7. Bibliografia

- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R – Endocrinologia. In : Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino, pp: 665-671. 1998a.
- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R - Ipofisi. In: Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. pp: 681-687. 1998b
- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R - Testicolo. In: Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. pp: 743-746. 1998c
- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R - La riproduzione. In: Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. pp: 769-778. 1998d
- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R – L'aggressività. In: Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. pp: 852-854. 1998e
- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R – La marcatura del territorio. In: Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. pp: 859. 1998f
- Aggugini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R – Il comportamento sessuale. In : Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. pp:. 864-865. 1998g
- Aronson LR, Cooper ML - Central versus peripheral genital desensitization and mating behavior in male cats: tonic and phasic effects. In: Ann N Y Acad Sci. 290:299-313. 1977
- Aronson LR, Cooper ML - Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. In: Anat Rec 157:71-78, 1967
- Axné E, Gustavsson T, Ström Holst B - Estradiol measurement after GnRH-stimulation as a method to diagnose the presence of ovaries in the female domestic cat. In: Theriogenology 70(2):186-91. 2008
- Belsito KR, Vester BM, Keel T, Graves TK, Swanson KS - Impact of ovariohysterectomy and food intake on body composition, physical activity, and adipose gene expression in cats. In: J Anim Sci. 87(2):594-602.2009
- Bertschinger HJ, Asa CS, Calle PP, Long JA, Bauman K, DeMatteo K, Jöchle W, Trigg TE, Human A - Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue deslorelin: preliminary observations. Journal of Reproduction

and Fertility, Supplement 57: 275-283, 2001

- Bertschinger HJ, Trigg TE, Jöchle W, Human A. - Induction of contraception in some African wild carnivores by downregulation of LH and FSH secretion using the GnRH analogue deslorelin. *Reproduction supplement* 60: 41-52, 2002.
- Christiansen IBJ - Andrologia del gatto maschio. In: *La riproduzione nel cane e nel gatto*. EdiErmes, Milano, pp 271-272, 1987a
- Christiansen IBJ - Controllo della fertilità nella femmina e nel maschio. In: *La riproduzione nel cane e nel gatto*. EdiErmes, Milano, pp 284-291, 1987b
- Christiansen IBJ - Ginecologia della femmina normale. In: *La riproduzione nel cane e nel gatto*. EdiErmes, Milano, pp 243-249, 1987c
- Concannon PW, Lein DH - Feline Reproduction. In: *Current veterinary therapy VIII*. Saunders, Philadelphia, 1983, p 192
- Concannon PW, Lein DH - Feline Reproduction. In: *Current veterinary therapy VIII*. Saunders, Philadelphia, 1983, p 932
- Concannon PW, et al - Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. In: *Biology Reproduction* 23:111, 1980
- Corletto F - $\alpha 2$ agonisti, Ketamina, Butorfanolo. In: *Anestesiologia del cane e del gatto*. Poletto Editore, pp 52, 61, 75, Milano, 2008
- Cunningham James G. - Controllo dello sviluppo delle gonadi e dei gameti. In: *Manuale di Fisiologia Veterinaria*. Antonio Delfino Editore, Roma, pp 376-379, 2006
- Dellmann HD, Eurell JA - Apparato genitale maschile. In: *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano pp: 303-330. 2000
- Dellmann HD, Eurell JA - Ipofisi. In: *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp: 387-394, 2000
- D'Occhio MJ, Aspden WJ - Characteristics of Luteinizing Hormone (LH) and Testosterone Secretion, Pituitary Responses to LH-Releasing Hormone (LHRH), and Reproductive Function in Young Bulls Receiving the LHRH Agonist Deslorelin: Effect of Castration on LH Responses to LHRH. *Biology of Reproduction* 54: 45-52, 1996.
- D'Occhio MJ, Fordyce G, Whyte TR, Jubb TF, Fitzpatrick LA, Cooper NJ, Aspden WJ, Bolam MJ, Trigg TE - Use of GnRH agonist implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and cows. in: *Animal Reproduction Science* 74: 151-162, 2002.
- EMEA - The European Agency for Evaluation of Medicinal Products Veterinary Medicine and Inspection - EMEA/V/C/109. Luglio 2007. www.emea.eu.int
- England CGW - Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dog. In: *J Reprod and fertility* (51):123-138. 1997
- Eymann J, Herbert CA, Thomson BP, Trigg TE, Cooper DW, Eckery DC - Effects of deslorelin

implants on reproduction in the common brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). In: *Reproduction, Fertility and Development* 19: 899-909, 2007.

- Feldman EC, Nelson RW - Feline Reproduction. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Saunders, pp 1016-1044, 2004
- FitzGerald MJT - Ipotalamo. In: *Neuroanatomia*. Editore Antonio Delfino, Roma, pp 217-224, 2000
- Gobello C. - Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: a review. In: *Theriogenology* 66(6-7):1560-7. 2006
- Goodrowe KL, Chakraborty PK, Wildt DE - Pituitary and gonadal response to exogenous LH-releasing hormone in the male domestic cat. In: *Endocrinology* 105: 175-181, 1985
- Gudermuth DF, Newton L, Daels P, Concannon P - Incidence of spontaneous ovulation in young, group-housed cats based on serum and faecal concentrations of progesterone. In: *J Reprod Fertil Suppl.* 51:177-84. 1997
- Guyton AC - Funzione riproduttiva ed endocrina dell'apparato genitale maschile. In: *Trattato di fisiologia medica*. Ed. EdiSES Napoli, pp 945-949, 2002
- Hart BL - Behavioral effect of castration. In: *Feline Practice* 3: 10-12, 1973
- Hart BL, Barrett RE - Effects of castration on fighting, roaming and urine spraying in adult male cats. *JAMVA* 163, pp 290-292, 1963
- Herbert CA, Trigg TE, Renfree MB, Eckery DC, Cooper DW - Effects of a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist Implant on Reproduction in a Male Marsupial, *Macropus eugenii*. In: *Biology of Reproduction* 70: 1836-1842, 2004.
- Houlton JE, McGlennon NJ - Castration and physeal closure in the cat. In: *Vet Rec.* 131(20):466-7. 1992
- Jemmett JE, Evans JM – A survey of sexual behaviour and reproduction in female cats. In: *J Small Animal Practice* 18: 31-37. 1977
- Jochle W, Jochle M - Reproductive and behavioral control in the male and female cat with progestins. Longterm field observations in individual animals. In: *Theriogenology* 3: 179-185, 1975
- Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS - Feline reproduction. In: *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders, pp: 389-451; 2001
- Johnstone IP, Bancroft BJ, McFarlane JR - Testosterone and androstenedione in the blood of the domestic tom cat. *Animal Reproduction Science*, 7:363-375, 1984
- Johnstone SD, Root MV, Olson PNS - Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. In: *Animal Reproduction Science*, vol 42: pp 261-274, 1996
- Junaidi A, Williamson PE, Cummins JM, Martin GB, Blackberry MA, Trigg TE - Use of a new

drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. In: *Reprod Fertil Dev.* 15:317-22. 2003

- Kirkpatrick JF - Seasonal testosterone level, testosterone clearance and testicular weights in male domestic cats. *Can. J. Zool.* 63: 1285-1287, Jan 1985
- Kirkpatrick JF -Seasonal testosterone levels, testosterone clearance and testicular weights in male domestic cats. In: *Can J Zoology* 63:1285-1287. 1985
- Kutzler M, Wood A - Non-surgical methods of contraception and sterilization. In: *Theriogenology* (3):514-25. 2006
- Kutzler MA - Estrus induction and synchronization in canids and felids. In: *Theriogenology* 68(3):354-74. 2007
- Lacoste D, Dubé D, Trudel C, Bélanger A, Labrie F. - Normal gonadal functions and fertility after 23 months of treatment of prepubertal male and female dogs with the GnRH agonist [D-Trp6, des-Gly-NH2(10)]GnRH ethylamide. In: *J Androl.* 10(6):456-65. 1989
- Laflamme DP - Understanding and managing obesity in dogs and cats. In: *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 36(6):1283-95. 2006
- Levy JK, Miller LA, Crawford PC, Ritchey JW, Ross MK, Fagerstone KA - GnRH immunocontraception of male cats. In: *Theriogenology* 62, 1116-1130, 2004
- Lofstedt RM-The estrous cycle of domestic cat. In: *Compend Continuous Education* 4:52,1982
- M.J.Swenson, W.O.Reece – Riproduzione maschile; Attività riproduttiva nella femmina. In: *Dukes Fisiologia degli Animali Domestici.* Idelson Gnocchi, Napoli, pp722; pp736. 2002
- Memon MA, Ganjam VK, Pavletic MM, Schelling SH - Use of Human chorionic Gonadotropin stimulation test to detect a retained testis in a cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol 201, n°10. 1992
- Midrio M- Funzioni dell'ipotalamo. In: *Compendio di Fisiologia del Sistema Nervoso.* Ed. Libreria Progetto, Padova, pp 238, 1996
- Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jöchle W, Trigg TE - Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. In: *J Reprod Fertil Suppl.* 57:269-73. 2001
- Nguyen PG, Dumon HJ, Siliart BS, Martin LJ, Sergheraert R, Biourge VC - Effects of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in cats. *Am J Vet Res.* 65(12):1708-13. 2004
- Nickel R, Schummer A, Siferle E - Sistema nervoso centrale. In: *Trattato di Anatomia degli Animali Domestici* vol IV. Casa Editrice Ambrosiana, Milano pp 138, 1988
- Olson PN, Kustritz MV, Johnston SD - Early-age neutering of dogs and cats in the United

States (a review). In: J Reprod Fertil Suppl.57:223-32. 2001

- Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Sherer D, Sorenmo KU - Association between ovariectomy and feline mammary carcinoma. In: J Vet Intern Med. 9(4):560-3. 2005
- Padula AM - GnRh analogues: agonists and antagonists. In: Animal Reproduction Science 88:115-126. 2005
- Pineda MH, Dooley MP - Surgical and chemical vasectomy in the cat. Am J Vet Res 45: 291-300, 1984
- Pryor A, Hart BL, Bain MJ, Cliff KD - Causes of urine marking in cats and effect of environmental management on frequency of marking. In: Journal of the American Veterinary Medical Association, vol 219, pp1709-1713. 2001
- Romagnoli S - Deslorelin in Small Animal Andrology. Atti 5° Congresso European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, Budapest, 7-9 Aprile 2006, pp 204-207
- Romagnoli S, Concannon PW - Clinical use of Progestins in Bitches and Queens: a review. In: Concannon PW, England J, Verstegen J, Linde-Forsberg C. Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org) Document number A1206.0903. 2003
- Romagnoli S, Stelletta C, Milani C, Gelli D, Falomo ME, Mollo A - Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. Reproduction in Domestic Animals, 44 (Suppl. 2):36-39, 2009
- Root MV, Johnston SD, Olson PNS - Estrous length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. In: J A M Anim Hosp Assoc 31:429-433. 1995
- Scott DW - Seasonal flank alopecia in ovariohysterectomized dogs. In: Cornell Vet. 80(2):187-95. 1990
- Seksel K - Feline urine spraying. Recent advances in Companion Animal Behavior Problems, 2000
- Shille VM - Clinical Approach to small animal reproductive problems. American Animals Hospice Association, 41st Annual Meeting, pp 501-509, 1974
- Shille VM, Sojka NJ - Feline reproduction. In: Ettinger SJ, Feldman EC (eds) Textbook of Veterinary Internal Medicine. WB Saunders Co,pp 1960. Philadelphia, 1995
- Spain CV, Scarlett JM, Houpt KA - Long-term risks and benefits of early-age gonadectomy in cats. In: J Am Vet Med Assoc. 224(3):372-9. 2001
- Stubbs WP, Bloomberg MS, Scruggs SL, Shille VM, Lane TJ - Effects of prepubertal gonadectomy on physical and behavioral development in cats. In: J Am Vet Med Assoc. 209(11):1864-71. 1996
- Swenson MJ, Reece WO - Riproduzione maschile. In: Fisiologia degli Animali Domestici (Dukes), Idelson-Gnocchi, Napoli, pp 722-734. 2002

- Swenson MJ, Reece WO - Attività riproduttiva della femmina. In: *Fisiologia degli Animali Domestici* (Dukes), Idelson-Gnocchi, Napoli, pp: 736-742;746-754. 2002
- Toydemir TSF, Kilcarslan MR, Olgac V - The effect of GnRH analogue Deslorelin implants on reproduction in female domestic cat. In: *International Symposium on Canine and Feline Reproduction*. Vienna, 2008
- Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchan-uthai T. - A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. In: *Theriogenology* 66(6-7):1507-12. Oct 2006. Epub 2006
- Trigg TE, Wright PJ, Armour AF, Williamson PE, Junaidi A, Martin GB, Doyle AG, Walsh J. - Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* supplement 57, pp 255-261, 2001
- Tsutsui T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A, Stabenfeldt GH - Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season. In: *Jpn Vet Sci* 52: 801-806, 1990
- Wildt DE, Chan SY, Seager SW, Chakraborty PK - Ovarian activity, circulating hormones, and sexual behavior in the cat. I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the estrous period without mating. In: *Biol Reprod.* 25(1):15-28. 1981
- Wildt DE, Lawler DF - Laparoscopic sterilization of the bitch and queen by uterine horn occlusion. In: *Am J Vet Res.* 46(4):864-9. 1985
- Zawistowski S, Morris J, Salman MD, Ruch-Gallie R. - Population dynamics, overpopulation, and the welfare of companion animals: new insights on old and new data. In: *J Appl Anim Welf Sci* 1(3):193-206. 1998
- Zoppi, Daniele - Variazioni della concentrazione sierica del testosterone in seguito alla somministrazione di un agonista del GnRH (deslorelin) nel gatto maschio. Padua thesis, 2005

8. Ringraziamenti

Ai miei genitori e alla mia famiglia, per avermi sempre sostenuto in tutti questi anni di studio; senza di voi non sarei arrivata fin qui. In particolare a mio fratello Petri, il mio tecnico personale del pc, reperibile (volente o nolente) ad ogni ora.

Alle mie nonne, a quella che fortunatamente è presente e a quella che purtroppo da poco ci ha lasciato: grazie per avermi aiutata a crescere e aver contribuito a farmi diventare una donna.

Al mio fidanzato e (spero!) futuro sposo Simone, grazie per la pazienza e la comprensione che sei riuscito ad avere con me, per l'aiuto e soprattutto per amarmi incondizionatamente.

Ai compagni di tutti questi anni di Università, Luana, Sara, Elisa, Martina, Elena, Nicola, Juri, Roberto e Daniele: è stato un bellissimo periodo proprio perché ho potuto dividerlo con voi! (e rimanere sana di mente nonostante tutto..).

Alle compagne acquisite solo nell'ultimo anno, Agnese, Alessandra, Paola, Silvia e Chiara: è stato un peccato non avervi conosciute prima.

Alle mie amiche di una vita, Lucia ed Elisa, anche se ci vediamo così poco, è bello che il nostro rapporto rimanga sempre di amicizia sincera.

Alle mie amiche Sara, Elisa, Martina ed Elisa: grazie per avermi accolta tra di voi con affetto.

Ai miei amici "acquisiti", Giuseppe, Francesca, Michele, Valentina, Marco, Gloria, Valentina Elisa, Giulio, Luigi, Clarissa, Linda ed Ennio che, nonostante la mia vita sociale soprattutto nell'ultimo anno fosse praticamente ridotta a zero, mi hanno voluto bene comunque.

A tutte le mie compagne di appartamento, ai vicini di casa e a tutte le persone diverse e meravigliose che ho potuto conoscere: Daria, Giulia, Clara, Selina, Lisa, Roberto, Matteo, Fabio. Sperando di non aver dimenticato nessuno, grazie a tutti, ognuno sa il perché.

A tutti coloro che mi hanno aiutata, e agli anestesisti per la loro disponibilità.

Allo staff della Clinica Veterinaria "S.Francesco" del dottor Sandro Zucchetta, per avermi insegnato tanto.

Ai miei gatti Ugo, Tigre e Birba, che non c'è più.

A tutte le persone che mi hanno permesso di compiere il mio studio affidandomi i loro gatti, grazie.