

ANDAMENTO DELLA RELAXINA IN CORSO DI ABORTO INDOTTO FARMACOLOGICAMENTE

P. PONZIO, A. STARVAGGI CUCUZZA, C. SEMITA, L. VINCENTI

Dipartimento di Patologia Animale - Grugliasco (To)

Riassunto

Monitoraggio della relaxina in corso di interruzione farmacologica della gravidanza indesiderata nella cagna mediante l'utilizzo del "Reprochek Relaxin®", test in commercio per la diagnosi di gravidanza, prodotto dalla "Synbiotics Corporation" (USA) e distribuito in Italia dalla ditta "Merial". I risultati ottenuti confermano l'attendibilità per quanto riguarda la diagnosi di gravidanza, mentre dimostrano la necessità di un utilizzo in associazione con altri metodi per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento farmacologico in corso di aborto indotto.

Summary

During pharmacological abortion induction in the bitch the relaxin was monitored with "Reprocheck Relaxin®", produced by "Synbiotic Corporation" (USA), pregnancy test. The results confirmed that the test is reliable for pregnancy diagnosis but it is advisable to associate it with other methods when it is utilized for monitoring the effectiveness of the pharmacological protocol of abortion.

INTRODUZIONE

Nella corrente pratica ambulatoriale viene richiesto di diagnosticare lo stato di gravidanza di una cagna il più precocemente possibile dall'avvenuto o presunto accoppiamento; questa esigenza è particolarmente sentita in caso di accoppiamenti indesiderati e specialmente qualora la cagna, per scelta o per esigenza (ad es., in soggetti da adibire comunque alla riproduzione o per impossibilità a gestire il postoperatorio), non sia da destinare alla sterilizzazione chirurgica.

In realtà non esiste un metodo che consenta, nella specie in esame, di accertare lo stato gravidico prima della fine della terza settimana: in questo stadio la gravidanza può essere rilevata clinicamente tramite palpazione transaddominale o per via ecografica.

Non tutti gli ambulatori hanno la disponibilità di un apparecchio ecografico e quindi si crea l'esigenza di usufruire di mezzi d'indagine alternativi, quali ad esempio gli esami di laboratorio (Tabb. 1, 2). Al riguardo, vale ricordare che nella cagna non è possibile distinguere tra

fase luteinica ciclica e gravidica, mediante dosaggio del progesterone ematico.

Recentemente è stato messo in commercio un test di gravidanza per la cagna (Reprochek Relaxin®, Synbiotics Corporation, USA, distribuito in Italia dalla Merial), basato sulla rilevazione della relaxina, ormone che si innalza in maniera significativa durante il corso della gravidanza. Tale ormone risulta essere prodotto da placenta, corpo luteo e ghiandole mammarie^{6,18}. La relaxina interviene nel mantenimento della gravidanza inibendo l'attività contrattile dell'utero e stimolandone lo sviluppo, così da permettere l'impianto fetale; inoltre, in associazione ad estrogeni e progesterone, prepara l'apparato riproduttore al parto. Il tasso ematico di detto ormone può essere dosato a partire dalla fine della terza settimana di gestazione e raggiunge l'apice alla quinta, per poi diminuire gradatamente, fino a 7-8 settimane dopo il parto¹⁷. Partendo dalle peculiarità di questa molecola, ne sono stati valutati i tassi in soggetti durante il trattamento per interruzione di gravidanza indesiderata.

I protocolli farmacologici impiegabili nella specie canina sono molteplici ed in grado di agire in diversi momenti dopo l'accoppiamento (pre-post impianto)^{1,2,4,5,7,8,9,10,12,13,14,16,20}; in questo contesto viene preso in considerazione quello utilizzato routinariamente dagli Autori¹¹ che prevede un inter-

¹Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 12/5/2002 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 17/6/2002.

Tabella 1
Metodi convenzionali utilizzabili per la diagnosi di gravidanza nella cagna

Metodo	Periodo	Note
PALPAZIONE	25-32 gg	dd con raccolte uterine
ES. ECOGRAFICO	21 gg post ovulaz.	costo apparecchiature preparazione soggetto
ES. RADIOGRAFICO	43-54 gg p.a. 46-49 gg dal picco LH	tardivo valutabile n° dei feti

Tabella 2
Metodi di laboratorio utilizzabili per la diagnosi di gravidanza nella cagna

Metodo	Note
PROGESTERONE	incremento in G+ ed in pseudogavidanza
PROLATTINA	specie specifico – modesto aumento in metaestro
RELAXINA	incremento in G+ / test di stimolo (naloxone)

vento tardivo (post impianto) solo sui soggetti di cui si è accertata la gravidanza mediante ecografia.

In un precedente lavoro¹⁵ sono stati valutati limiti e convenienza d'impiego del test della relaxina per la diagnosi di gravidanza: in questa sede si intende verificarne la possibilità di utilizzo come strumento di monitoraggio delle cagne sottoposte ad interruzione della gravidanza.

MATERIALI E METODI

In un periodo di 12 mesi, sono stati sottoposti a diagnosi ecografica di gravidanza 19 soggetti di età, razza e taglia diversa (Tab. 3), condotti a visita presso l'Ospedale Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Torino. Tutti gli animali sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso: il sangue, almeno 1 ml/soggetto, è stato raccolto in provette contenenti litio-eparina e centrifugato per separarne il plasma.

In base ai risultati dell'indagine ecografica, e al successivo approccio stabilito in accordo con i singoli proprietari, le cagne sono state suddivise in tre differenti gruppi (Tab. 2):

- 1) non gravide (n.=6);
- 2) gravide, non destinate a trattamento abortivo farmacologico: gravidanza voluta/sterilizzazione (n.=7);
- 3) gravide, destinate al trattamento abortivo (n.=8).

I soggetti di cui al gruppo 3) sono stati sottoposti ad interruzione farmacologica della gravidanza, impiegando l'associazione antiprolattinica (cabergolina) luteolitica (cloprostenolo)^{10,11}, secondo un protocollo da tempo utilizzato dagli autori¹¹: durante il trattamento, le cagne sono state sottoposte a monitoraggio ecografico ogni 48 h, fino

Tabella 3
Soggetti sottoposti a diagnosi ecografica di gravidanza

Caso n°	Razza	Età	Giorni dall'accoppiamento*
1	Bulldog Americano	3 anni	≥ 27
2	Bracco Italiano	3 anni	35
3	Bassotto	1.5 anni	29
4	Pinscher	1.5 anni	25
5	Border Collie	1.5 anni	25
6	Meticcica	1 anno	≥ 27
7	Meticcica	9 mesi	21-24
8	Meticcica	9 anni	≥ 27
9	Boxer	3 anni	≥ 27
10	Leonberger	4 anni	28
11	Siberian Husky	1 anno	≥ 27
12	Rottweiler	2 anni	≥ 27
13	Rottweiler	3 anni	25-26
14	Meticcica	3 anni	≥ 27
15	Meticcica	1 anno	22-24
16	Dobermann	3 anni	≥ 27
17	Meticcica	2 anni	21-24
18	Meticcica	4 anni	25-26
19	Meticcica	5 anni	25-26

*Determinazione in base alle anamnesi fornite dai proprietari.

alla rilevazione dell'avvenuta morte fetale; nel contempo, sono stati eseguiti prelievi ematici per studiare le variazioni plasmatiche della relaxina in risposta al trattamento stesso, fino a completamento del trattamento o qualora il test risultasse negativo.

Tutti i prelievi sono stati testati per la relaxina: il kit commerciale impiegato (Reprochek Relaxin®) è in grado di rilevare la relaxina sia nel sangue intero che nel plasma della cagna: il valore soglia riportato dalla casa produttrice è pari a 10 ng/ml.

L'esame si basa sulla tecnica sandwich ELISA: la relaxina eventualmente presente nel campione in esame si lega ad un anticorpo monoclonale di coniglio adsorbito alle pareti del pozzetto, quindi il complesso antigene-anticorpo formatosi viene fatto interagire con un anticorpo monoclonale di cane marcato con perossidasi, il quale a sua volta determina una reazione colorimetrica quando si aggiunge l'apposito substrato. In caso di positività, i campioni presentano una colorazione azzurra, e la lettura dei risultati può essere condotta sia direttamente, sia mediante spettrofotometro.

In ogni seduta d'esame è necessario comprendere un controllo positivo ed uno negativo, forniti nel kit: il numero di campioni esaminabili varia quindi in funzione del numero delle sedute stesse.

Per le prove in questione è stato necessario un kit: i risultati, letti direttamente, sono stati espressi, basandosi sui controlli positivo (+) e negativo (-) di riferimento, come: reazione assente (-); lieve (-/+); scarsa (+/-); evidente (+); intensa (++); molto intensa (+++).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sono stati testati 35 campioni di plasma, suddivisi come riportato in Tabella 5.

Riguardo la lettura diretta dell'esito del test, la reazione cromatica presentata dai campioni positivi è sempre stata ben evidente, ed aumenta d'intensità in funzione della concentrazione di relaxina, ossia con il momento, più o meno avanzato, di gravidanza. Alcuni campioni negativi possono assumere una lieve colorazione, comunque meno

Tabella 4
Distribuzione dei soggetti in esame nei 3 gruppi

Gruppo n°	Caso n°
1	13, 14, 15, 17, 18, 19
2	1, 2, 4, 5, 6, 11, 12
3	3, 7, 8, 9, 10, 16

Tabella 5
Confronto tra esito del test e controllo ecografico nei 3 gruppi di studio

Gruppo n°	Caso n°	Rilievi ecografici	Trattamento (giorni)	Risultati test relaxina(*)
1	13	Non gravida	---	-
	14	Non gravida	---	-/+
	15	Non gravida	---	-/+
	17	Non gravida	---	-/+
	18	Non gravida	---	-
2	19	Non gravida	---	-/+
	1	3-4 feti	---	+++
	2	6 feti	---	+++
	4	4 feti	---	++
	5	5-7 feti	---	++
	6	3-4 feti	---	+++
	11	6 feti	---	+++
3	3	5 feti	T0	++
		Scarsa vitalità feti	T2	+
		Assenza formazioni	T4	-
	7	1 feto	T0	-
		Arresto sviluppo	T2	-
		Riassorbimento	T4	-
	8	2 feti	T0	+
		Scarsa vitalità feti	T2	++
		Riassorbimento	T4	+/-
		Riassorbimento avanzato	T6	+/-
	9	7 feti	T0	+
		Iniziale sofferenza fetale	T2	+
		4 feti in riassorbimento	T4	-
	10	5 feti	T0	++
		Iniziale sofferenza fetale	T2	++
		Riassorbimento	T4	+/-
		Riassorbimento avanzato	T6	+/-
	16	≥ 7 feti	T0	+++
		Nessun segno di sofferenza	T2	+++
Scarsa vitalità feti		T4	++	
Iniziale riassorbimento		T6	++	
Riassorbimento avanzato		T8	+	

(*): - = reazione assente; +/- = lieve (aspecifica); +/- = scarsa; + = evidente; ++ = intensa; +++ = molto intensa.

intensa rispetto al controllo positivo, imputabile probabilmente alla presenza di fonti alternative, rispetto alla placenta, di produzione dell'ormone in esame.

In merito ai soggetti inseriti nel gruppo 3), è interessante notare come una netta negativizzazione dei campioni si sia presentata solo in 2 cagne su 6 (casi n° 3 e 9), precisamente in quelle che hanno presentato espulsione dei feti (parziale nel caso n° 9): anche se l'incidenza di tale evenienza, rispetto ad altri protocolli abortivi più tardivi e/o aggressivi, è molto bassa. L'aborto con espulsione può comunque verificarsi, più frequentemente quando il trattamento è intrapreso in stadi più avanzati della gravidanza (25-35 giorni dall'accoppiamento).

Il caso n° 7 è risultato relaxina-negativo, pur rivelandosi gravido all'indagine ecografica, perché i prelievi sono stati condotti tra il 21° ed il 24° giorno dall'accoppiamento: in effetti, le indicazioni del kit riportano come limite temporale inferiore il 21° giorno successivo all'accoppiamento, quindi è ipotizzabile che il tasso plasmatico della relaxina non abbia fatto in tempo, a causa del trattamento abortivo intrapreso, a raggiungere il valore soglia. Nei restanti casi (n° 8, 10, 16), invece, la presenza di relaxina in circolo è stata rilevata per tempi protratti, anche quando, all'esame ecografico, sono stati evidenziati la morte ed il riassorbimento fetali.

Il fenomeno potrebbe essere spiegato col fatto che non tutte le placenti degenerano con la stessa celerità e quindi non tutti i feti vengono a morte contemporaneamente. La durata del trattamento viene influenzata e risulta maggiore nel caso in cui il numero di feti presenti in utero è elevato e il momento della gravidanza in cui si interviene è più tardivo: per questo, fino all'ultimo, la relaxina può essere riscontrata nei campioni sottoposti al test. Generalmente i proprietari, anche se informati delle alternative all'ovarioisterectomia hanno richiesto la sterilizzazione chirurgica per evitare, in futuro, altre gravidanze indesiderate (gruppo 2). I proprietari delle cagne del gruppo 3 hanno invece optato per l'interruzione di gravidanza ritenuta più facile da gestire, meno traumatizzante per l'animale senza precludere la possibilità di avere una cucciolata in un momento successivo.

Concludendo, in base ai risultati ottenuti, la ricerca della relaxina ematica rappresenta un interessante strumento per la diagnosi di gravidanza, in alternativa o in associazione all'esame ecografico. Unico svantaggio è rappresentato dalla questione economica: i costi risultano, infatti, elevati nel caso di singolo campione nella realtà ambulatoriale, più convenienti invece nel contesto di un laboratorio di analisi veterinarie che è in grado di ottimizzare al meglio il test commerciale eseguendo un numero maggiore di campioni contemporaneamente.

In merito al suo impiego nel controllo dell'efficienza del protocollo farmacologico di interruzione di gravidanza, essa non sembra, ad una prima indagine, garantire risultati così costanti e corrispondenti alla reale situazione in corso di aborto. Mediante monitoraggio ecografico e/o del progesterone, infatti, si osserva rispettivamente degenerazione fetale e caduta dei tassi ormonali al di sotto dei limiti soglia di mantenimento della gravidanza quindi si può essere certi dell'avvenuto aborto mentre il dosaggio della relaxina può indicare ancora dei valori al di sopra di quelli di riferimento in quanto viene influenzata dalla presenza ancora attiva di placenti in via di degenerazione. A tal proposito quindi possiamo confermare il suo utilizzo per la diagnosi di gravi-

danza in assenza di apparecchiatura ecografica, mentre per quanto riguarda l'utilizzo per il monitoraggio dell'efficacia del trattamento farmacologico in corso di interruzione di gravidanza indesiderata, al momento attuale, ne consigliamo l'uso solo in associazione con altri metodi di monitoraggio a seconda delle disponibilità ambulatoriali (progesterone o esame ecografico) precedentemente descritti.

Parole chiave

Cagna, relaxina, aborto.

Key words

Bitch, relaxin, abortion.

Bibliografia

1. Concannon P.W. "Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogesterone mifepristone in dogs". *J. Reprod. and Fertility* 1990.
2. Concannon P.W., Meyers-Wallen V.N. "Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats" *J.A.V.M.A.* 1991; 198 (7).
3. Feldman E.C., Nelson R.W. "Endocrinologia e riproduzione del cane e del gatto" ed. UTET - Torino (2° ed.) 1998.
4. Feldman E.C., Davidson A.P., Nelson R.W., Nyland T.G., Munro C. "Prostaglandin induction of abortion in pregnant bitches after misalliance" *J.A.V.M.A.* 1993; 202 (11).
5. Galac S., Kooistra H.S., Butinar J., Bevers M.M., Dieleman S.J., Voorhout G., Okkens A.C. "Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist" *Theriogenology* 2000; 53:941-950.
6. Goldsmith L.T., Lust G., Steinetz B.G. (1994). Transmission of relaxin from lactating bitches to their offspring via suckling. *Biol. Rep.* 50: 258-265.
7. Jackson W.F., Johnston S.D.. "Pregnancy prevention and termination". In Kirk RW (ed.): *Current Veterinary Therapy. Small Animal Practice VII.* Philadelphia, WB Saunders Co 1980:1239-1241.
8. Oliva O., Colombo G., Nava G.A., Cairoli F. "Evaluation of a new non-hormonal substance for terminating pregnancy in bitches in clinical trials". *J. Small Anim. Pract.* 1987; 28:223-228.
9. Olson P.N., Nett T.M., Bowen R.A., Amann R.P., Sawyer H.R., Gorell T.A., Niswender G.D., Pickett B.W., Phemister R.D. "A need for sterilization, contraceptives and abortifacients: abandoned and unwanted pets. Part III: abortifacients" *The Compendium on Continuing Education* 1986; 8 (4):235-240.
10. Parodi S.G.B. "Aborto indotto con cloprostenolo e cabergolina" *Summa* 1998; 5:29-32.
11. Ponzio P., Starvaggi Cucuzza A., Quaranta G. (2001). Ultrasonographic evaluation of a post-implant abortive protocol in unwanted mated bitches. *EVSSAR Symposium: Milano, 1ST March 2001:129-130.*
12. Post K. "Induced pregnancy termination in dogs". *Theriogenology Handbook* 1995 C2:1.
13. Romagnoli S., Cela M., Camillo F. "Use of prostaglandin F2alpha for early pregnancy termination in the mismated bitch" *Vet. Clin. North Am. (Small Anim. Pract.)* 1991; 21:487.
14. Ronsin P., Berthelot X. "L'aborto provocato nella cagna" *Summa* 1996; 7:35-42.
15. Rota A., Mollo A., Starvaggi Cucuzza A., Vincenti L. (2001). Valutazione di un test commerciale di gravidanza per la cagna. *Veterinaria* anno 15, n.2, Giugno 2001:75-77.
16. Soderberg S.F., Olson P.N. "Abortifacients" In Kirk RW ed. *Current Veterinary Therapy VIII.* Philadelphia, WB Saunders Co 1983:945-946.
17. Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Harvey H.J. (1989). Serum relaxin and progesterone concentration in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 50 (1):68-71.
18. Tsutsui T., Stewart D.R. (1991). Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *J. Vet. Med. Sci.* 53 (6):1025-1029.
19. Watts J.R., Wright P.J. "Calcium cloprostenol administered at a continuous low dosage induces luteolysis and abortion in bitches" *Theriogenology* 1997; 48 (8):1313-1328.
20. Zone M., Wanke M., Rebuello M., Loza M., Mestre J., Duchene A., Concannon P. "Termination of pregnancy in dogs by oral administration of dexamethasone" *Theriogenology* 1995; 43:487-494.