



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**CONTROLLO dell'ATTIVITÀ RIPRODUTTIVA
nella GATTA mediante l'USO
di PROGESTINICI a BASSE DOSI**

Relatore
Prof. Stefano Romagnoli

Laureanda
Anna Ghezzo
Matricola n. 1001685

ANNO ACCADEMICO 2015-2016

INDICE

RIASSUNTO	4
1. INTRODUZIONE	6
1.1 Cenni di fisiologia riproduttiva nella gatta	11
1.1.1 L'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio	
1.1.2 Stagionalità e pubertà	
1.1.3 Il ciclo riproduttivo	
1.2 Manifestazione ed identificazione dell'estro	18
1.2.1 Comportamento riproduttivo	
1.2.2 Dosaggi ormonali	
1.2.3 Citologia vaginale	
1.2.4 Ecografia dell'apparato riproduttore	
1.3 Metodi contraccettivi farmacologici: i progestinici	24
1.3.1 Generalità	
1.3.2 Dosi ed effetti collaterali	
1.4 Scopo della tesi	30
2. MATERIALI E METODI	31
2.1 Animali coinvolti nella ricerca	31
2.2 Protocollo sperimentale	34
2.3 Controlli successivi	41
2.4 Analisi dei dati	43
3. RISULTATI	44
3.1 Visita clinica	44
3.2 Esami del sangue e dosaggio ormonale	54
3.3 Citologia vaginale	65
3.4 Ecografia dell'apparato riproduttore	70
3.5 Questionari etologici	73
3.6 Intervallo trattamento-ritorno in calore	76
3.7 Ovarioisterectomia ed esame istologico	78

4. DISCUSSIONE	83
5. CONCLUSIONE	98
6. ALLEGATI	102
7. BIBLIOGRAFIA	110
8. RINGRAZIAMENTI	115

RIASSUNTO

Lo scopo del lavoro è quello di testare l'efficacia di due farmaci progestinici registrati per l'uso nella gatta per il controllo del ciclo riproduttivo, utilizzando dosaggi inferiori a quelli universalmente riportati in letteratura, e andando ad analizzarne gli effetti a livello riproduttivo, comportamentale e della salute generale dell'animale.

Lo studio è stato condotto su 10 gatte di proprietà, di razze diverse e di età compresa tra i 5 mesi e i 7 anni, sane, intere, post-puberi e non in diestro (valore limite accettato di progesterone: 1,0 ng/ml); un gruppo di animali (7 gatte) è stato trattato con proligestone (Covinan®, Merck) alla dose di 20 mg/kg SC in un'unica iniezione, mentre a un secondo gruppo (3 gatte) è stato somministrato per os megestrolo acetato (Estropill®, Merck) alla dose di 5 gocce/kg/die (0,010-0,012 mg/kg/die) per 6-10 settimane consecutive. È stata constatata l'idoneità al trattamento dopo esecuzione di una prima visita clinica comprendente esame ematobiochimico, dosaggio ormonale, colpocitologia ed ecografia uterina; al proprietario è stato inoltre consegnato un questionario comportamentale. Tutte queste procedure sono state ripetute in egual maniera (con l'aggiunta di un test di stimolo con GnRH due ore prima del prelievo del sangue per il dosaggio di estradiolo e progesterone) ad una seconda visita (a 1 mese di distanza), una terza (a 3 mesi di distanza) ed una quarta visita di controllo (dopo il ritorno in calore, compresa tra i 4 e i 9 mesi di distanza), nella quale su richiesta del proprietario è stata eseguita un'ovarioisterectomia e l'esame istologico dell'apparato riproduttore della gatta.

I risultati hanno dimostrato un'efficace soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e l'inibizione dello sviluppo follicolare, dell'ovulazione e delle manifestazioni estrali in tutte le gatte. La durata media dell'effetto è stata di circa 6 mesi e mezzo $\pm$ 2 mesi per il proligestone, e di 36 giorni in media dopo la sospensione della somministrazione di megestrolo acetato. Non ci sono state ripercussioni sulla fertilità post-trattamento. Le condizioni cliniche generali degli animali sperimentali si sono sempre mantenute ottimali. Si è verificato un caso di decolorazione del pelo nel punto di inoculo a 9 mesi dall'iniezione, ed un caso di lieve aumento del parenchima mammario dopo 4 mesi dall'inizio della terapia per os, risoltosi spontaneamente dopo la sterilizzazione. Non è stato rilevato un aumento significativo del peso, né cambiamenti comportamentali rilevanti, se non la scomparsa degli atteggiamenti legati alla sfera sessuale; in una gatta è aumentata l'aggressività. Gli unici parametri ematobiochimici variati significativamente sono stati colesterolo e creatinina (aumentati), proteine totali e albumina (diminuite). La progesteronemia è scesa gradualmente in tutti i soggetti e si è sempre mantenuta a livelli basali, mentre la concentrazione di estradiolo è calata con costanza solo nel gruppo trattato con megestrolo acetato. La colpocitologia ha rivelato la tendenza all'aumento della percentuale media delle cellule non cheratinizzate e la speculare diminuzione di quelle cheratinizzate; in un solo soggetto le cellule cheratinizzate sono invece aumentate nei primi tre mesi. L'aspetto ecografico ed il diametro medio uterino non hanno subito variazioni. All'istologia non sono stati rilevati alterazioni patologiche a livello di utero e ovaie. Un solo soggetto ha sviluppato, ad un mese dal trattamento con proligestone, iperplasia endometriale cistica e piometra.

Lo studio dimostra l'efficacia e la sicurezza dell'uso di questi due farmaci per il controllo della riproduzione nella gatta anche a dosi inferiori a quelle finora comunemente utilizzate, purché impiegati coscientemente dopo approfondite analisi atte a selezionare i pazienti idonei.

ABSTRACT

The aim of this study was to prove the efficacy of two progestagens, registered for reproduction control in the queen, using dosages which are lower than those commonly used in the literature, and to analyse their effects on general health, reproduction and behaviour.

10 domestic, healthy, intact, post-pubertal and non-diestrual (acceptable progesterone limit value: 1,0 ng/ml) queens were selected for this research; their age varied from 5 months up to 7 years. 7 queens were treated with one injection of 20 mg/kg SC proligestone (Covinan®, Merck), and 3 queens received 5 drops/kg daily (0,010-0,012 mg/kg/day) megestrol acetate for 6-10 weeks consecutively. At the first examination they underwent clinical exam, complete blood work, progesterone assay, vaginal cytology and uterine ultrasonography; the owner was also given an ethological questionnaire. All these procedures were repeated identically (with the addition of a GnRH-stimulation test and estradiol and progesterone assay) after one month, three months and after returning in heat (between 4 and 9 months); in this last examination the owners could decide whether to submit their cats to ovariohysterectomy and histological exam of the reproductive tract.

The results demonstrated an effective suppression of the hypothalamus-hypophysis-gonads axis in all the queens tested, along with the inhibition of follicular development, ovulation and estrous behaviours. The average effect lasted $6,5 \pm 2$ months for proligestone, and 36 days after withholding treatment with megestrol acetate. No negative effect on post-treatment fertility was noted. General clinical conditions were maintained at optimal level throughout the study. A case of hair discoloration was observed at the injection site after 9 months from the treatment. A moderate growth of mammary parenchyma was noted after 4 months from the first administration of megestrol acetate, regressed spontaneously after surgical sterilization. No significant body weight increase was measured, not even behavioural changes except for sexual behaviours; in one cat aggressiveness increased. On haematology, only four parameters varied significantly: cholesterol and creatinin raised, albumin and total proteins decreased. Progesterone dropped gradually at basal level in every queen, while estradiol constantly lowered only in the megestrol acetate group. Vaginal cytology showed a progressive increase in the average percentage of non keratinized cells and a simultaneous decrease of keratinized cells; in just one cat keratinized cells raised during the first three months of treatment. Uterine aspect and diameter detected on ultrasounds remained constant. Histology did not revealed any pathological change of the ovaries or the uterus. Only one cat developed cystic endometrial hyperplasia and pyometra after one month following proligestone injection.

This study demonstrates the efficiency and the safety of the use of these drugs for the control of reproduction in the queen, even at a lower dosage, but only after assuring that patients are carefully selected and properly followed up.

1. INTRODUZIONE

Il gatto domestico (*Felis catus*) è uno degli animali da compagnia più diffusi a livello mondiale, e la sua convivenza con l'uomo comprende diversi livelli di interazione. È compito del medico veterinario assicurare, nei limiti delle sue possibilità, il benessere dell'animale, tenendo in considerazione la natura del gatto e del rapporto con il proprietario.

Secondo una recente stima esistono circa 200 milioni di gatti domestici in tutto il mondo, e alcuni paesi (inclusi Usa, UK e Cina) il numero di gatti è addirittura superiore a quello dei cani da compagnia (Bernstein, 2005). Il controllo della riproduzione in questa specie assume dunque un ruolo chiave nella clinica dei piccoli animali, ed è spesso argomento di grande attualità nei dibattiti riguardanti la gestione ed il benessere della popolazione felina. In particolare, il problema della sovrappopolazione felina ha assunto negli ultimi anni un'importanza globale, e numerosi stati si sono adoperati nella ricerca di un metodo efficace e allo stesso tempo eticamente sostenibile per il controllo delle nascite.

L'alto tasso di fertilità dei gatti può potenzialmente permettere di moltiplicare il loro numero in modo esponenziale in poco tempo, ed il crescente aumento delle colonie feline ha sollevato non poche questioni di carattere etico e sanitario. Basti pensare che nel corso della sua vita riproduttiva di circa 10 anni una gatta cui venga consentito di accoppiarsi liberamente è in grado di dar luce a due o tre nidiati all'anno, ognuna composta in media da tre o quattro gattini, per un totale di 50-150 gattini (Feldman e Nelson, 1996). È opinione comune che, se in numero particolarmente elevato, i gatti randagi possano rappresentare una minaccia alla salute pubblica per la trasmissione di zoonosi (rabbia e *Toxoplasma* le più sentite), per la diffusione di malattie ad altre specie o ai gatti domestici, così come possano essere fonte di disturbo pubblico (ad esempio per il rumore e la contaminazione fecale), ed un pericolo per l'equilibrio dell'ecosistema a causa del loro istinto predatorio (Robertson, 2008).

Ancora oggi, soprattutto negli Stati Uniti, l'eutanasia è il metodo d'elezione per il controllo del sovrannumero di randagi. Secondo The Humane Society of the United States, ogni anno vengono sottoposti ad eutanasia tra gli 8 e 10 milioni di cani e gatti di canile (Kutzler e Wood, 2006). Tuttavia, la crescente sensibilità dell'opinione pubblica nei confronti del benessere animale ed il problema etico di sopprimere soggetti sani hanno condotto all'adozione di sistemi alternativi. Il programma "trap-neuter-return" (TNR) è stato attuato

con successo in molti paesi ed ha permesso un controllo mirato delle colonie feline (Sparkes et al., 2013). Esso consiste nella cattura di gatti randagi, la loro sterilizzazione da parte di un veterinario abilitato, l'identificazione permanente dello stato di sterilizzazione (generalmente viene tagliato un lembo del padiglione auricolare durante l'anestesia), la vaccinazione per la rabbia (nei paesi dove è richiesto) e infine il loro rilascio nei pressi della colonia d'origine. I limiti di questo sistema sono sicuramente rappresentati dai costi delle infrastrutture e dei materiali necessari per l'intervento, dalla mancanza di volontari qualificati, oltre che dall'alto livello di stress per gli animali. Inoltre la sua efficienza può essere compromessa dal continuo abbandono o dalla migrazione di nuovi individui nelle aree in cui è in atto tale programma. Occorre quindi affiancare il TNR ad un programma di educazione dei proprietari contro l'abbandono e a favore della sterilizzazione precoce (Natoli et al., 2006).

Ciò nonostante, molti proprietari permettono ai loro animali di riprodursi liberamente, dimostrandosi riluttanti alla sterilizzazione chirurgica. Uno studio americano sottolinea la presenza di un numero di nascite di gatti non pianificate quasi tre volte superiore a quella di cani, con motivazioni legate in prima istanza al costo della sterilizzazione, seguito dalla mancanza di riconoscimento del calore o dal presupposto che la gatta fosse troppo giovane per procreare, e infine dalla convinzione dell'inutilità o inconvenienza di tale procedura (New et al., 2004). In un altro studio condotto su alcuni studenti ispanici in un'università del South Texas (Faver, 2009), invece, i possessori di gatti risultano essere significativamente più propensi alla sterilizzazione dei loro animali rispetto ai proprietari di cani, più per benefici relazionali che funzionali; il rifiuto della sterilizzazione nel 41% dei casi è dovuto al desiderio di avere dei cuccioli dal proprio animale, e per il 25% al costo dell'operazione. Il più grosso ostacolo è comunque rappresentato dalla disinformazione del proprietario medio riguardo la riproduzione felina: in Inghilterra il 26% dei possessori di gatti crede che le femmine non possano procreare al di sotto di un anno di età, il 23% è convinto invece che la gatta debba partorire almeno una volta prima di poter essere sterilizzata (Welsh et al., 2014).

La sterilizzazione chirurgica rimane il metodo contraccettivo più diffuso per il controllo della riproduzione degli animali domestici, ed in particolare per le femmine l'ovarioisterectomia (OVH) è preferita alla semplice ovariectomia (OVE), privilegiata nei paesi europei, sebbene tra le due non sia stata dimostrata, almeno per la cagna, alcuna significativa differenza nell'incidenza di complicazioni a medio o lungo termine (Okkens et al., 1997). La sterilizzazione è consigliabile in tutti quegli animali non destinati alla carriera di

riproduttori, in quanto consente di ridurre il rischio di malattie riproduttive, in particolar modo delle patologie mammarie. Nelle cagne l'ovarioisterectomia effettuata prima della pubertà riduce il rischio di tumori mammari allo 0,5%, all'8% se eseguita dopo il primo calore, al 26% dopo il secondo calore; oltre il terzo calore o dopo i 2,5 anni di età il rischio è paragonabile a quello delle femmine intere (Schneider et al.,1969). Le gatte, invece, se sottoposte a sterilizzazione prima dei sei mesi di età vedono una riduzione del 91% del rischio di sviluppare un carcinoma mammario, e dell'86% se l'intervento viene eseguito entro l'anno d'età (Overley et al., 2005). Cagne e gatte sterilizzate sono inoltre meno soggette all'incidenza di patologie uterine (piometra, neoplasie), ovariche (cisti o tumori), patologie mediate da estrogeni (iperplasia/prolasso vaginale, aplasia midollare) o dal progesterone (pseudociesi, ipertrofia mammaria), oppure legate alla gravidanza e al parto (aborto, distocie, prolasso uterino). I soggetti sterilizzati inoltre risultano essere meno attivi e aggressivi nei confronti dell'uomo e dei propri simili, meno propensi al vagabondaggio, oltre che esenti dalla manifestazione dei comportamenti estrali spesso mal tollerati dai proprietari (Romagnoli e Sontas, 2010).

La sterilizzazione chirurgica è d'altro canto una tecnica irreversibile e, come ogni intervento chirurgico, non esente da rischi quali:

- Rischio chirurgico generico: legato all'anestesia, emorragie vaginali o intra-addominali, deiscenza o infezione della sutura, peritonite, legature accidentali di ureteri e conseguente idronefrosi, fistole uretero-vaginali;
- Ritorno in calore ("*ovarian remnant syndrome*"), nel caso in cui rimanga in addome un frammento di tessuto ovarico potenzialmente funzionante;
- Infezione del moncone uterino, con formazione di granulomi o piometra;
- Obesità, causata dalla diminuzione del metabolismo basale e dall'aumento dell'appetito e assunzione di cibo (nel gatto già dopo tre giorni dall'intervento);
- Incontinenza urinaria, per il calo di estrogeni che porta alla diminuita capacità dello sfintere uretrale esterno di mantenere la continenza (riscontrato nella cagna ma non nella gatta);
- Problemi ortopedici, causati dalla ritardata chiusura delle fisi nei soggetti sterilizzati in età precoce (possibile predisposizione a patologie quali displasia dell'anca, rottura dei legamenti crociati); osteoporosi (gli estrogeni mantengono un corretto metabolismo osseo stimolando la secrezione di calcitonina, inibitrice del riassorbimento osseo);

- Cambiamenti comportamentali, soprattutto nelle cagne dominanti in cui si può verificare un'esacerbazione della loro reattività (Romagnoli e Sontas, 2010).

La sempre crescente sensibilità del proprietario nei confronti del benessere del proprio animale, nonché le diverse ragioni sociali, culturali, economiche e legislative (ad esempio in Norvegia la sterilizzazione chirurgica è proibita), ed infine la necessità di trattare un numero maggiore di animali con il minor dispendio di tempo e denaro possibile nella gestione delle colonie feline, ha incentivato la ricerca di metodi reversibili e meno invasivi alternativi alla chirurgia. La cosiddetta “sterilizzazione chimica” si avvale di numerosi prodotti farmaceutici atti a controllare e sopprimere per periodi più o meno lunghi l'attività riproduttiva negli animali da compagnia. In particolare, i trattamenti ormonali con progestinici, androgeni, agonisti del GnRH e melatonina sono tra i più studiati ed utilizzati nel gatto.

Gli impianti di melatonina (Melovine®, CEVA VETEM) sono attualmente in fase di sperimentazione e non ancora registrati per l'uso negli animali da compagnia, e si basano sulla caratteristica del gatto di essere un “long-day breeder”, ovvero di concentrare la sua attività riproduttiva nei mesi in cui le ore di luce totali siano superiori a 14; l'esposizione a un numero di ore di luce per giorno inferiore ad 8 induce generalmente un anestro prolungato (Prescott, 1973). Un fotoperiodo decrescente è connesso ad un aumento della concertazione endogena di melatonina, seguita dalla diminuzione dell'attività sessuale, perciò la sua somministrazione esogena potrebbe potenzialmente mimare questa condizione fisiologica (Goericke-Pesch et al., 2014). Un impianto di 18 mg/gatto sembra avere un effetto di durata variabile tra i 2 e i 4 mesi (Gimenez et al., 2009).

Per quanto riguarda gli androgeni, la loro somministrazione provoca nelle femmine la soppressione del rilascio di gonadotropina, inibendo quindi la funzionalità delle gonadi; tuttavia il loro utilizzo nel gatto è stato scoraggiato poiché la dose efficace (50 µg/die) si avvicina di molto a quella tossica (60 µg/die), con il rischio di sviluppare epatotossicità e tirotossicità, oltre che portare ad un aumento dell'aggressività e della mascolinizzazione (Shille e Sojka, 1995).

Ampiamente utilizzati, anche se registrati ufficialmente solo per il cane, sono gli agonisti del GnRH. Il deslorelin (Suprelorin®, Virbac), causa un'iperstimolazione della ghiandola pituitaria, provocando inizialmente una significativa secrezione di LH e FSH con conseguente follicologenesi ed ovulazione. Dopo circa una decina di giorni, la concentrazione costantemente elevata di GnRH instaura una *down-regulation* dei suoi

recettori ipofisari, seguita da una protratta quiescenza ovarica. Gli impianti sottocutanei di deslorelin da 4,7 mg (Suprelorin®, Virbac) sono stati con successo testati nelle gatte con minimi effetti collaterali, e sono caratterizzati da una durata che può variare dai 15 ai 26 mesi; tuttavia non è ancora chiaro se la ciclicità e la fertilità post-trattamento possano ritornare alla completa normalità (Munson, 2006; Johnston e Rhodes, 2015).

Nei cani sono stati sperimentati anche degli antagonisti del GnRH che, a differenza degli agonisti, sviluppano un effetto immediato subito dopo il trattamento, andando a bloccare in modo competitivo i recettori per il GnRH a livello ipofisario (Vickery et al., 1989).

La nuova frontiera nell'ambito della sterilizzazione farmacologica è rappresentata dall'immunocontraccezione, che si avvale di vaccini che hanno come bersaglio il GnRH, i recettori dell'LH o le proteine della zona pellucida, sebbene la loro efficacia si sia finora dimostrata limitata, specialmente nei gatti (Kutzler e Wood, 2006).

La ricerca di citotossine che colpiscano selettivamente i neuroni preposti alla secrezione di GnRH o le cellule staminali delle gonadi, o ancora il silenziamento di determinati geni coinvolti nella regolazione del ciclo riproduttivo sono tecniche tuttora in fase di studio (Johnston e Rhodes, 2015).

Nonostante la grande varietà di prodotti studiati e commercializzati, i progestinici si classificano di certo tra i più comunemente utilizzati negli animali da compagnia per il controllo e la soppressione temporanea o prolungata dell'estro. Si tratta di analoghi sintetici del progesterone, composti tendenzialmente efficaci e sicuri, anche se non esenti da effetti collaterali, talvolta anche gravi, ben delineati nei numerosi studi condotti a riguardo. Le molteplici controindicazioni hanno spesso finito col gettare cattiva luce su questi farmaci, scoraggiandone l'uso da parte dei veterinari; tuttavia occorre interpretare con prudenza la letteratura, poiché nella maggior parte dei casi gli effetti indesiderati più temuti si sono verificati con protocolli sperimentali che utilizzavano dosi eccessive, oppure pazienti con caratteristiche cliniche o in fasi del ciclo riproduttivo non idonei al trattamento. Sono necessari ulteriori studi atti a stabilire la minima dose efficace per ridurre l'incidenza di effetti indesiderati e sfruttare pienamente e con coscienza la potenzialità di questi farmaci.

1.1 CENNI DI FISIOLOGIA RIPRODUTTIVA DELLA GATTA

1.1.1 L'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio

In tutti gli animali domestici, la riproduzione è primariamente regolata da una complessa interazione tra l'ambiente che li circonda ed il sistema nervoso ed endocrino. La responsabilità fondamentale del sistema nervoso è quella di tradurre gli stimoli esterni (visivi, uditivi, olfattivi e tattili) in segnali nervosi, attraverso riflessi neuronali semplici e riflessi neuroendocrini. Nel primo caso il neurone sensitivo (afferente) prende sinapsi con un interneurone spinale, a sua volta collegato a neuroni efferenti che viaggiano direttamente verso il tessuto d'interesse. La risposta è generalmente immediata e di breve durata. Nel secondo caso, invece, i neuroni efferenti formano sinapsi con altri neuroni situati nell'ipotalamo, i quali rilasciano neurormoni all'interno della circolazione sanguigna, permettendo un controllo remoto dell'organo bersaglio, più lento ma più duraturo rispetto a quello prettamente nervoso.

L'ipotalamo è una porzione del diencefalo posta ventralmente al talamo, dove forma il pavimento del terzo ventricolo, ed è costituito da numerosi *cluster* di corpi neuronali denominati nuclei ipotalamici, ognuno adibito alla regolazione di funzioni specifiche: dal controllo della temperatura corporea e della circolazione sanguigna, alla regolazione dell'assunzione di cibo e liquidi, il ciclo sonno-veglia, il comportamento sessuale ed i meccanismi di difesa e attacco. Le sedi dei due gruppi di nuclei predisposti al controllo della riproduzione sono rappresentate dal centro tonico (costituito dal nucleo ventromediale e arcuato, e responsabile di secrezioni pulsatili e costanti di neurormoni) e il centro fasico (anche detto centro pre-ovulatorio, rappresentato dal nucleo preottico, sovrachiasmico e dall'area ipotalamica anteriore, e responsabile di picchi secretori). I neuroni di queste regioni secernono il GnRH (*gonadotropin releasing hormone*), ormone decapeptidico che stimola la produzione di gonadotropine (FSH: *follicle stimulating hormone*, ormone follicolo-stimolante; LH: *luteinizing hormone*, ormone luteinizzante) da parte della ghiandola pituitaria. La funzionalità del centro fasico è strettamente correlata alla concentrazione plasmatica di estrogeni: infatti, elevati livelli di estradiolo in assenza di progesterone scatenano una depolarizzazione dei corpi neuronali delle cellule neurosecretorie ipotalamiche, con conseguente massivo rilascio di GnRH. Viceversa, il centro tonico sembra esser soggetto ad una depolarizzazione spontanea, anche se si presume influenzata dalla concentrazione di progesterone.

L'ipotalamo è collegato all'ipofisi per mezzo di una sofisticata rete di capillari denominata sistema portale ipotalamo-ipofisario, di fondamentale importanza poiché permette ad una minuta quantità di ormoni di agire direttamente sulle cellule target del lobo anteriore dell'ipofisi senza essere diluita dalla circolazione sistemica.

Una caratteristica comune a tutti questi neuroni è la regolazione a feed-back esercitata dai prodotti della secrezione sull'attività delle cellule ipotalamiche. Un feedback positivo stimola la secrezione di GnRH, mentre quello negativo la sopprime. Elevate concentrazioni di progesterone, ad esempio, inibiscono fortemente i neuroni ipotalamici consentendo solamente una produzione basale di GnRH (e quindi di FSH e LH), non sufficiente alle fasi ultime dello sviluppo follicolare o al picco preovulatorio di LH. Viceversa, alti livelli di estradiolo stimolano positivamente il centro fasico con conseguente liberazione massiccia di GnRH che causa il rilascio di elevate quantità di LH, inducendo le fasi terminali dello sviluppo dei follicoli e quindi l'ovulazione. Da qui deriva la convinzione di molti endocrinologi che il centro tonico risponda principalmente a feedback negativi, al contrario del centro fasico più sensibile a feedback di tipo positivo (Senger, 2003).

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: un lobo posteriore, la neuroipofisi, prolungamento diretto del sistema nervoso centrale e collegata all'ipotalamo tramite l'infundibulo, con lo scopo di secernere direttamente in circolo due ormoni ipotalamici, quali vasopressina e ossitocina; un lobo anteriore, l'adenipofisi, adibita al rilascio di ormoni trofici quali TSH (*thyroid-stimulating hormone*), ACTH (*adrenocorticotropic hormone*), GH (*growth hormone*), FSH, LH e prolattina; il lobo intermedio, di minore importanza ai fini della riproduzione.

La gonadotropine ipofisarie (FSH e LH) sono due glicoproteine che svolgono un ruolo essenziale per la promozione dello sviluppo delle gonadi, la steroidogenesi e la produzione dei gameti. In particolare, nella femmina l'FSH agisce sulle cellule della granulosa dell'ovaio inducendo lo sviluppo follicolare e la produzione di estradiolo; l'LH invece interagisce con le cellule della teca interna e luteali stimolando l'ovulazione, la formazione del corpo luteo e la secrezione di progesterone. Nel maschio l'LH stimola le cellule interstiziali del Leydig a produrre testosterone, mentre l'FSH è determinante per la spermatogenesi e la conversione a livello delle cellule di Sertoli, tramite l'enzima aromatasi, del testosterone in estradiolo.

Le cellule della granulosa producono inoltre un altro ormone, l'inibina, che opera un feedback negativo sul rilascio di FSH, controllando quindi lo sviluppo dei follicoli.

Una delle maggiori differenze tra i sessi consiste nel fatto che nel maschio non esiste un centro fasico ipotalamico (inattivato nella vita fetale) poiché gli spermatozoi vengono prodotti e secreti in modo continuo, senza la necessità di un picco di rilascio di LH, indispensabile invece nella femmina per la rottura della superficie ovarica ed il rilascio degli oociti (Sjaastad et al., 2010).

1.1.2 Stagionalità e Pubertà

Il gatto è un animale poliestrale stagionale, manifesta cioè il calore in maniera continuativa per diversi mesi all'anno, alternando questi periodi di ciclicità regolare a intervalli di quiescenza (anestro stagionale). L'alternanza delle fasi riproduttive con quelle di anestro è regolata dal rapporto di luce e buio (o fotoperiodo) nell'arco della giornata: servono infatti almeno 12-14 ore di luce affinché l'ipotalamo felino produca il fattore di rilascio delle gonadotropine stimolanti la crescita e la maturazione dei follicoli tramite l'immissione pulsatile in circolo di FSH e LH. Un numero inferiore alle 8 ore di luce inibisce invece la follicologenesi (Leyva et al., 1989).

Alle nostre latitudini il numero di ore di luce/die diminuisce progressivamente a partire dal solstizio d'estate (21 giugno), per riaumentare gradualmente dopo il solstizio d'inverno (21 dicembre). Pertanto le gatte esposte al fotoperiodo naturale nei paesi della fascia mediterranea sospendono generalmente l'attività riproduttiva durante il periodo estivo-autunnale (agosto-novembre) per riprendere a ciclare verso metà inverno (gennaio-febbraio), con picchi riproduttivi nei mesi di febbraio-marzo e maggio-giugno. Potenzialmente, gatte tenute perennemente in casa o comunque esposte costantemente alla luce artificiale potrebbero risultare recettive tutto l'anno. D'altra parte, livelli di luce inadeguati per intensità o durata possono essere responsabili di anestri prolungati nei gatti in allevamento (Feldman e Nelson, 1996). Inoltre, le gatte di razza siamese mostrano minore sensibilità al fotoperiodo e tendono a manifestare cicli estrali durante l'intero corso dell'anno. Al contrario, i gatti a pelo lungo risultano più sensibili alle ore totali di luce e raramente entrano in estro durante l'inverno (Shille e Sojka, 1995).

Un ruolo chiave nella regolazione della ciclicità è svolto dalla melatonina, ormone prodotto dall'epifisi (o ghiandola pineale) durante le ore di buio, che nella gatta esplica un effetto

anti-gonadotropo (inibisce cioè il rilascio di FSH e LH) bloccando l'attività riproduttiva. La melatonina raggiunge perciò livelli molto elevati durante l'anestro, mentre da gennaio inizia a calare, accompagnata da un graduale aumento della prolattina (Sjaastad et al., 2010).

La pubertà, ovvero la prima manifestazione dell'estro che coincide con l'inizio della produzione dei gameti, risulta assai variabile e può dipendere dallo stato di nutrizione, l'ambiente sociale, dalla razza e dal periodo dell'anno. È stato dimostrato che il principale fattore condizionante l'instaurarsi della pubertà è rappresentato dalla capacità dell'ipotalamo di produrre sufficiente GnRH, che si è notato essere influenzata dalla glicemia e dalla concentrazione di acidi grassi ematici, entrambi indicatori dello stato metabolico dell'animale. Vengono infatti attivati dei neuroni glucosio-sensibili o sensibili agli acidi grassi che a loro volta vanno a stimolare i neuroni secernenti GnRH. La leptina, peptide prodotto dagli adipociti, sembra invece stimolare in maniera diretta i neuroni produttori di GnRH (Senger, 2003).

La maggior parte delle gatte vanno in calore non appena raggiunto il peso di 2,5-3,0 kg (circa l'80% del peso vivo da adulte), e ciò avviene intorno al 6°-7° mese di vita. Nella gatta comune europea normalmente il primo calore si manifesta tra il 5° e il 12° mese, frequentemente nel primo autunno-inverno dopo i quattro mesi di età. Le razze pure a pelo lungo, come ad esempio i persiani, possono arrivare alla pubertà al 12°-18° mese di vita, mentre altre razze, specialmente quelle a pelo corto come il Burmese, risultano mature già a 4 mesi (England, 2010).

Si è visto che gatte libere di vagabondare ("free-roaming") possono raggiungere la maturità in età più precoce rispetto a gatte tenute costantemente in casa. Inoltre, elementi quali convivenza di gruppo o introduzione di un maschio o una femmina in estro forniscono stimoli sociali che possono accelerare la comparsa del calore (Michel, 1993).

Anche il periodo di nascita influenza notevolmente la pubertà: gatte nate in estate o autunno spesso manifestano segni estrali per la prima volta alla primavera successiva (a 5-6 mesi di età), mentre le femmine nate tra ottobre e dicembre potrebbero non essere sessualmente mature all'inizio della stagione riproduttiva pochi mesi più tardi, perciò potrebbero presentare il primo calore alla stagione seguente (all'età di 12-16 mesi) (England, 2010).

1.1.3 Il ciclo riproduttivo

Il ciclo riproduttivo degli animali domestici viene generalmente suddiviso nelle fasi di proestro, estro, metaestro e diestro. Questa classificazione non è però interamente applicabile alla gatta, in quanto non è corretto utilizzare il termine metaestro. I felini, infatti, sono specie ad ovulazione indotta, ovvero provocata dal coito; nel caso l'accoppiamento non avvenga, si avrà un estro anovulatorio ed i follicoli andranno incontro ad un graduale processo di atrofia associata ad una transitoria remissione dei sintomi del calore, cui farà seguito una nuova ondata di crescita follicolare. Questa fase non prevede dunque la formazione di corpi lutei (quindi non è un vero e proprio metaestro), e viene indicata con il termine di interestro o postestro. Si distinguono quindi le seguenti fasi del ciclo estrale:

Anestro: fase di assenza di ciclicità e riposo sessuale, che si presenta naturalmente dopo il parto durante la lattazione o nei periodi di ridotte ore di luce/die associati ad un aumento di secrezione di melatonina. Le ovaie sono di dimensioni ridotte, i follicoli assenti o inferiori ai 0,5 mm di diametro, e sia il valore degli estrogeni che del progesterone si mantengono a livelli minimi (England, 2010).

Proestro: periodo in cui la femmina inizia a manifestare i primi segni di calore ed esercitare un forte richiamo per il maschio, pur non accettando il coito. Esso coincide con l'iniziale accrescimento dei follicoli ovarici sotto stimolazione di FSH e LH, e con l'inizio della sintesi di estradiolo 17β (E_2). Durante questa fase avviene un reclutamento selettivo in media di 3-7 follicoli ovarici che passano dalle dimensioni di 1 mm a 1,5 mm in prossimità dell'estro, a discapito degli altri che vanno incontro ad atresia. La sua durata può variare dalle poche ore ai 2-5 giorni (Feldman e Nelson, 1996).

Estro: è la fase di recettività sessuale ed è caratterizzata dalla maturazione dei follicoli pre-ovulatori e da un'intensa liberazione di estrogeni. Le ovaie aumentano di volume e presentano follicoli di 2 o 3 mm dall'aspetto traslucido (Feldman e Nelson, 1996). La durata dell'estro è mediamente di 6-8 giorni, con un range che varia da 2 a 19 giorni. Oltre che dalle caratteristiche individuali, può essere influenzata anche dalla stagione: in primavera tende ad aumentare (5-14 giorni per ciclo) mentre cala nelle altre stagioni (1-6 giorni). Il coito, che induca o meno l'ovulazione, non sembra influenzare la durata della fase estrale (Root et al., 1995).

Trattandosi di una specie ad ovulazione indotta, la liberazione degli oociti avviene 24-27 ore dopo l'accoppiamento ed è sollecitata da un riflesso neuro-ormonale provocato dalla stimolazione meccanica da parte delle spicole peniene sulla mucosa vaginale al momento del coito. La stimolazione tattile è convertita in potenziale d'azione che viaggia attraverso il midollo spinale fino a raggiungere l'ipotalamo, dove innesca la secrezione di GnRH e il conseguente picco di LH (Senger, 2003). È stata dimostrata la necessità di accoppiamenti ripetuti per poter ottenere una concentrazione tale di LH da indurre la rottura dei follicoli. In particolare, il livello massimo di concentrazione plasmatica di LH sembra esser raggiunto dopo circa 2-4 ore dal momento in cui sono avvenuti dagli 8 ai 12 coiti, per poi tornare a livelli basali dopo 24 ore (Goodrowe et al., 1989). In un recente studio (Tsutsui et al., 2009), si è dimostrato che circa il 60% delle gatte coperte una sola volta al giorno 1 dell'estro ovulano, l'83% se coperte una volta al giorno 5, mentre il 100% delle gatte ovula dopo tre accoppiamenti successivi al giorno 5. Inoltre si verifica un tasso di concepimento inferiore dopo un solo accoppiamento rispetto a tre consecutivi; i risultati quindi suggeriscono di coprire la gatta più di una volta a metà dell'estro per sfruttarne al massimo le potenzialità riproduttive.

Esistono tuttavia gatte in cui anche un solo accoppiamento è sufficiente ad indurre il picco di LH, così come soggetti ad ovulazione spontanea (circa il 30% delle gatte, più frequentemente se in presenza di un gatto maschio o nelle femmine anziane) (England, 2010).

Interestro (o postestro): è un intervallo di inattività sessuale interposto tra picchi di funzionalità follicolare. Segue generalmente un calore anovulatorio ed è caratterizzato da basse concentrazioni di estradiolo e progesterone, e dalla scomparsa delle manifestazioni estrali. Può durare mediamente tra gli 8 e i 15 giorni, anche se in alcune razze orientali le onde follicolari si succedono in maniera così stretta da lasciare solo un minimo impercettibile intervallo tra due cicli e manifestare quindi un estro persistente (England, 2010).

Diestro: è presente quando avviene l'ovulazione ma senza concepimento. I corpi lutei, evidenziabili sull'ovaio come piccole formazioni beige o arancioni, si formano entro 24-48 ore dalla rottura del follicolo e rimangono funzionanti per circa 40-45 giorni producendo progesterone in quantità notevoli, dopodiché regrediscono spontaneamente. La gatta pertanto, pur nella stagione favorevole, non potrà manifestare un nuovo calore prima della loro totale scomparsa (questa condizione è anche chiamata pseudociesti o pseudo-

gravidanza). Anche l'utero risentirà dell'influenza del progesterone ipertrofizzandosi sensibilmente a livello endometriale, aumentando di tono e turgore e sviluppando una rugosità e irregolarità di superficie facilmente individuabile al tatto (England, 2010).

Dopo la gravidanza (che dura in media 63 giorni), l'estro può ripresentarsi 7-10 giorni dopo la luteolisi. In alcuni soggetti si può verificare il cosiddetto "calore da parto", cioè un estro fertile a pochissima distanza dal termine della gestazione, indice di un processo involutivo uterino notevolmente veloce. Se l'estro da parto non si manifesta, la gatta tornerà in calore 2-4 settimane dopo lo svezzamento (England, 2010).

Una schematizzazione del ciclo riproduttivo della gatta è fornita dalla Figura n°1, mentre la variazione di concentrazione dei principali ormoni durante le varie fasi dell'estro è rappresentata nella Figura n°2.

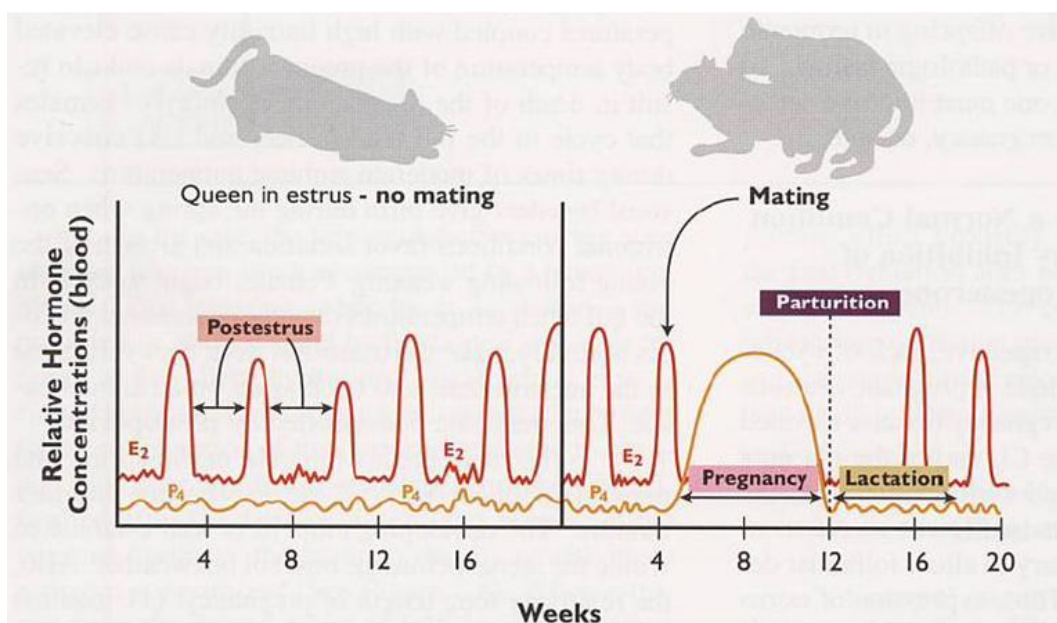


Figura n°1 - Rappresentazione schematica dell'andamento ormonale del ciclo riproduttivo della gatta. La fase ascendente dei picchi di estradiolo corrisponde a proestro e estro, quella discendente a interestro. L'accoppiamento provoca l'ovulazione cui segue una fase luteinica di 40 giorni, oppure una gravidanza di 65 giorni. (modificato da: Senger (2003) - Pathway to Pregnancy and Parturition, p.151)

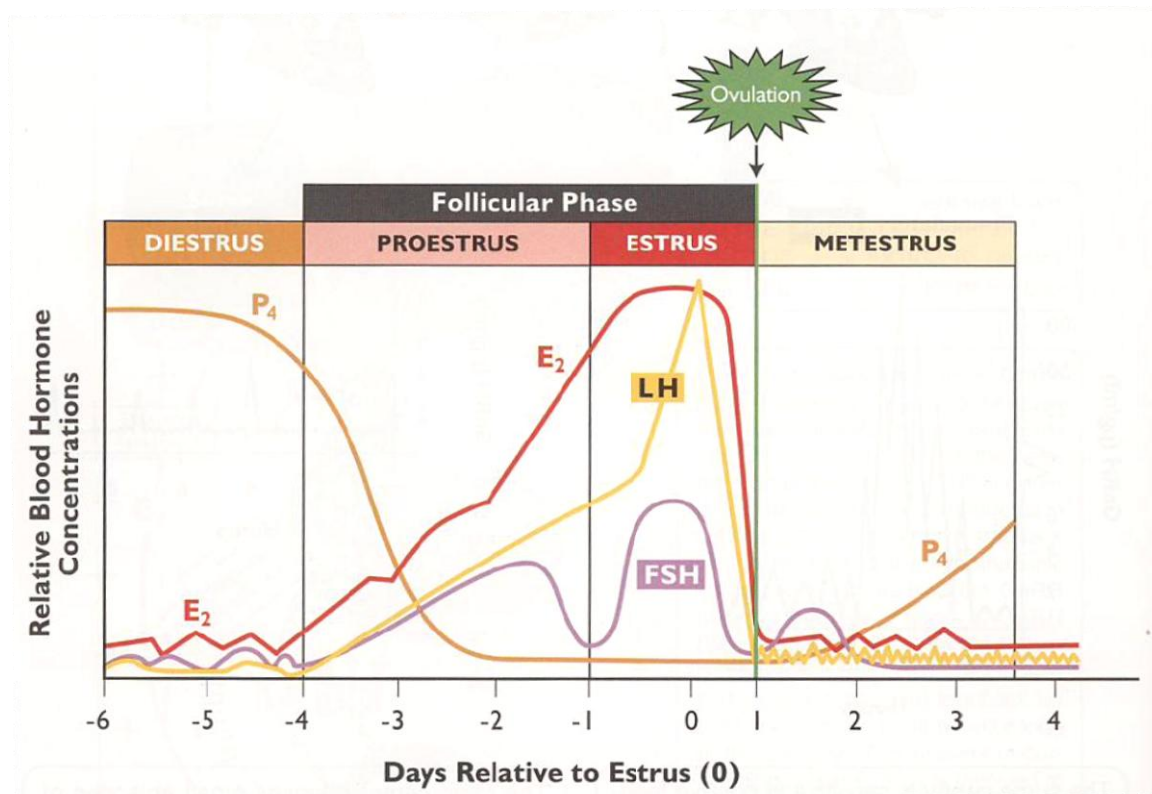


Figura n°2 - Variazioni ormonali caratteristiche del ciclo estrale. Il progesterone (P₄) cala alla scomparsa del corpo luteo (fine diestro), mentre FSH e LH salgono gradualmente causando la produzione di estrogeni (E₂) da parte dei follicoli in via di sviluppo (proestro). Raggiunto il livello soglia di estrogeni, si scatena il picco di LH che induce l'ovulazione. (modificato da: Senger (2003) - Pathway to Pregnancy and Parturition, p.168)

1.2 MANIFESTAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DELL'ESTRO

1.2.1 Comportamento riproduttivo

Durante il proestro i maschi sono attirati dalle femmine, che però non sono ancora sessualmente recettive. La gatta miagola, strofina il muso su oggetti, altri animali o persone e risulta più interattiva e socievole; alcune volte si riscontra anche un calo dell'appetito. Molte gatte eseguono stiramenti e contorsioni in decubito dorsale e laterale, aprendo e chiudendo le zampe. A volte la gatta inarca la schiena in lordosi, con gli arti anteriori premuti sul terreno ed i posteriori sollevati, compiendo movimenti di calpestio, e tenendo la coda deviata lateralmente mostrando la vulva. In questa fase tuttavia non accetta la monta e può dimostrarsi aggressiva nei confronti del maschio, soffiando e

graffiandolo. Non sono presenti né l'edema vulvare né le perdite ematiche tipiche della cagna. I segni comportamentali possono non essere costantemente evidenti e rilevabili, per questo spesso la femmina sembra passare da una fase di anestro apparente ad una di recettività sessuale e calore manifesto (Feldman e Nelson, 1996).

La gatta in pieno estro presenta comportamenti molto simili a quelli manifestati in proestro: miagola intensamente richiamando l'attenzione del maschio, assume una posizione lordotica con contrazioni spasmodiche del perineo, specie se accarezzata sul dorso, e spesso emette spruzzi di urina per marcare il territorio. A differenza del proestro, però, in questa fase essa accetta la monta. Gatte con temperamento nervoso o alla base della scala gerarchica possono non manifestare segni di calore: si parla in questo caso di estro silente (England, 2010).

Il corteggiamento avviene generalmente nelle ore notturne. Le gatte recettive rimangono accovacciate a una certa distanza dai maschi in competizione, i cui richiami vocali non sono associati solo al combattimento bensì anche alla fase di corteggiamento e accoppiamento. Il maschio dominante si avvicina alla femmina, strofinandola prima col mento e col muso per un periodo che può variare dai 10 secondi ai 5 minuti; quindi la afferra per la collottola (senza ferirla), ne stringe il treno anteriore con i propri arti anteriori e vi si posiziona a cavalcioni con i posteriori. L'intromissione e l'eiaculazione durano pochi secondi. Il maschio quindi si allontana rapidamente e la gatta manifesta la cosiddetta "reazione post-coitale", caratterizzata da un grido acuto (grido copulatorio) seguito da atti vigorosi di strofinamento, rotolamento e leccamento della regione genitale. Questa fase può durare dai 30 secondi ai 9 minuti, durante i quali la gatta respinge aggressivamente qualsiasi altro tentativo di avvicinamento da parte del maschio, che rimane in disparte. Quando la femmina è pronta per un nuovo accoppiamento sollecita nuovamente l'attenzione del maschio allungandosi davanti a lui o toccandolo con una zampa, fino al nuovo rapporto. Questi atteggiamenti si possono susseguire dalle 10 alle 30 volte nell'arco delle 24 ore e possono ripetersi anche nei giorni seguenti, separati da intervalli progressivamente crescenti. Il numero di coiti non condiziona la durata della fase estrale della femmina (Feldman e Nelson, 1996).

Le fasi di interestro, diestro e anestro non sono distinguibili dal punto di vista comportamentale, in quanto ognuna è caratterizzata dalla cessazione dell'attività sessuale e di conseguenza dalla scomparsa delle vocalizzazioni, rotolamenti e intensi sfregamenti.

1.2.2 Dosaggi ormonali

Tutte queste modificazioni comportamentali, così come quelle citologiche analizzate in seguito, sono da imputare alla variazione di concentrazione, durante le varie fasi del ciclo, di due ormoni principali: estradiolo e progesterone.

Gli estrogeni sono ormoni sintetizzati dal colesterolo e prodotti primariamente dall'ovaio, ma anche dalla placenta, dalla corteccia surrenale e dalle cellule del Sertoli nel maschio. Come il progesterone e gli altri ormoni steroidei, sono veicolati nel plasma legati a delle specifiche proteine di trasporto, e presentano un meccanismo d'azione intracellulare: grazie alla loro liposolubilità, attraversano facilmente la membrana plasmatica per andare a legarsi a specifici recettori nucleari, andando quindi ad influenzare direttamente la trascrizione del DNA e la sintesi delle proteine. La loro principale funzione è quella di ottimizzare la possibilità di fertilizzazione. Essi stimolano la crescita follicolare e la recettività sessuale, e preparano i genitali esterni e l'utero alla copula e al trasporto degli spermatozoi: aumentano il flusso sanguigno, l'edema e la secrezione di muco vaginale, promuovono la crescita delle ghiandole uterine ed il tono miometriale. Favoriscono inoltre lo sviluppo delle ghiandole mammarie e dei caratteri sessuali secondari.

Il progesterone è un ormone steroideo prodotto prevalentemente dal corpo luteo e la sua funzione principale è quella di creare le condizioni favorevoli alla crescita e allo sviluppo del feto. Esso stimola la secrezione delle ghiandole endometriali, previene ulteriori ovulazioni, sopprime le contrazioni uterine e contribuisce alla crescita e differenziazione delle ghiandole mammarie per la successiva produzione di latte (Sjaastad et al., 2010).

Nel corso dell'anestro o dell'interestro le concentrazioni di estradiolo e progesterone rimangono generalmente a livelli basali (rispettivamente inferiori a 15 pg/ml e 2 ng/ml), mentre in fase follicolinica prevalgono gli estrogeni che raggiungono livelli superiori ai 20 pg/ml. Spesso in meno di 24-48 ore dall'inizio del proestro si può assistere al raddoppio dei livelli sierici di E₂ (> 40 pg/ml), e proprio questa subitaneità ed intensità estrogenica, associata all'insorgenza improvvisa delle manifestazioni estrali, contraddistingue il calore nella gatta, a differenza delle modificazioni comportamentali più lente e graduali che caratterizzano la cagna. Dai 12-15 pg/ml dell'ultimo giorno di proestro si passa ai 25 pg/ml il primo giorno dell'estro, sfiorando i 45 pg/ml il terzo giorno e i 50-80 pg/ml al quinto. Il tasso di estrogeni rimane elevato per soli 3 o 4 giorni, per poi riprendere altrettanto rapidamente a calare. Al settimo giorno raggiunge nuovamente i 20-25 pg/ml per ricadere

al di sotto dei 10 pg/ml all'ottavo giorno, che può essere considerato come primo giorno di intervallo interestrale. Se l'ovulazione avviene, si ha la formazione dei corpi lutei, i quali iniziano a secernere progesterone già 24-48 ore dopo la loro formazione, raggiungendo livelli sierici di P4 maggiori di 1-2 ng/ml; al terzo giorno dall'ovulazione può superare i 5 ng/ml. Qualora una gatta abbia ovulato ma non concepito, i livelli di estrogeni si manterranno basali, mentre quelli di progesterone tenderanno comunque ad accrescersi progressivamente fino a raggiungere e superare i 20 ng/ml entro il 14°-18° giorno del diestro, e attenuarsi infine gradualmente a partire dal 35° giorno. In assenza di corpi lutei funzionanti, invece, i livelli di P4 permangono inferiori ai 0,5 ng/ml (Feldman e Nelson, 1996).

Sulla base di queste informazioni, la valutazione dei dosaggi ormonali può permettere di identificare il momento specifico della fase estrale. I metodi utilizzati per la misurazione dei livelli ormonali nel sangue sfruttano la metodica radioimmunologica, immunoenzimatica e la chemiluminescenza. Diversamente dalla cagna, nella gatta la misurazione dei livelli sierici di estrogeni e progesterone non è indispensabile per stabilire il momento più favorevole per l'accoppiamento, in quanto specie ad ovulazione indotta. L'analisi degli estrogeni può comunque essere utilizzata per confermare o meno la presenza di attività follicolare ovarica, soprattutto in quegli animali che tendono a non manifestare i comportamenti tipici estrali. Se l'estradiolo infatti sale al di sopra dei 60 pg/ml generalmente si è in presenza di una fase follicologenetica; valori di 10 pg/ml sono invece associati a fasi interfollicolari (Edqvist e Stabenfeldt, 1989). La titolazione del progesterone 2 o 3 giorni dopo il coito può comunque dimostrare l'avvenuta ovulazione (se > 5 ng/ml) (Von Heimendahl e England, 2010).

1.2.3 Citologia vaginale

A queste metodiche si affianca spesso la citologia vaginale (o colpocitologia), che fornisce un'indicazione sullo stato riproduttivo del soggetto, soprattutto nel caso di estri poco evidenti. Si tratta di una tecnica rapida, economica e poco invasiva per l'animale, che può essere comodamente svolta in ambulatorio. Occorre ricordare che, se da un lato la condizione estrale facilita la manovra, dall'altro questa stimolazione può indurre l'ovulazione e la deiscenza dei follicoli. Inoltre circa un terzo delle gatte può manifestare comportamenti estrali prima che lo striscio contenga cellule cheratinizzate; viene dunque

utilizzata più per verificare la presenza del calore che per predirne l'inizio (Von Heimendahl e England, 2010).

Si deve considerare che la morfologia delle cellule epiteliali che esfoliano dalla parete vaginale varia in funzione della concentrazione di estrogeni. Questi ultimi infatti condizionano lo spessore della parete vaginale aumentandone il numero di strati cellulari, per cui da un epitelio cuboidale semplice (tipico dell'anestro), si arriva ad un epitelio squamoso pluristratificato cheratinizzato (periodo fertile), per ritornare infine ad un nuovo epitelio cuboidale in concomitanza con l'aumento del progesterone in fase diestrale (Von Heimendahl e England, 2010).

Il campione viene dapprima osservato al microscopio ottico a basso ingrandimento (4x) per dedurre il grado di "trasparenza", che dipende dalla percentuale di detriti non cellulari, di filamenti di muco e dall'assenza di aggregati cellulari. Si passa quindi ad un ingrandimento più elevato (10x o 40x), in modo da poter osservare nel dettaglio i particolari dei singoli elementi cellulari e poterli classificare come:

- cellule parabasali, cellule di piccole dimensioni ancora in vita nel lume vaginale, originarie dagli strati più prossimi a quello germinativo o basale. Sono rotonde o leggermente ovalari, con nucleo grande e vescicoloso e citoplasma scarso;
- cellule intermedie (piccole e grandi), di dimensioni più ampie, appiattite, con margini ovalari o irregolarmente arrotondati. Presentano un nucleo relativamente più piccolo, e rappresentano il primo stato di sofferenza cellulare che precede la necrosi;
- cellule cheratinizzate (o corneificate), elementi citologici di maggiori dimensioni, principali responsabili dell'ispessimento dello strato mucoso vaginale, che sotto stimolo estrogenico passa da pochi strati a 15-20 piani cellulari, con conseguente necrobiosi delle cellule più superficiali. Hanno morfologia poligonale con margini ampi, piatti, irregolari e nuclei picnotici o assenti.

Al contrario della cagna, gli eritrociti non sono presenti in proestro, così come sono generalmente rari o assenti i granulociti polimorfonucleati che caratterizzano lo striscio tipico del diestro canino.

Perciò, a seconda delle diverse fasi del ciclo riproduttivo, nella gatta troveremo i seguenti quadri citologici:

- Proestro: aumenta la trasparenza del preparato, che facilita l'osservazione degli elementi cellulari; questo fenomeno (detto "clearing") si può osservare due giorni prima dell'inizio della fase follicolare nel 10% delle gatte. La percentuale delle cellule cheratinizzate inizia a salire ($> 10\%$), e per contro diminuisce quella di cellule parabasali e intermedie;
- Estro: aumenta la fluidificazione estrogeno-dipendente delle secrezioni vaginali e di conseguenza la trasparenza di fondo, che raggiunge il suo massimo stadio. Varia inoltre la distribuzione percentuale dei vari tipi cellulari: le cellule corneificate raggiungono il 40-60% tra il 4° e il 7° giorno dell'estro, per poi diminuire gradualmente a meno del 10% al 12°-13° giorno; le cellule intermedie discendono dal 40% a meno del 10%, mentre le parabasali vengono a mancare del tutto, per ritornare al 5-10% circa 5 giorni dopo la fine della fase follicolare;
- Interestro: il quadro citologico è nuovamente dominato dalla presenza di elementi epiteliali nucleati, con cellule parabasali $< 5\%$ e le intermedie che oscillano tra il 20 e il 60%; le cellule cheratinizzate non superano il 4% delle cellule totali;
- Anestro: è del tutto simile ad un interestro prolungato, con un lieve aumento delle cellule parabasali (fino al 10%) e intermedie (fino al 70%), il tutto su uno sfondo ricco di muco e detriti cellulari (Feldman e Nelson, 1996).

1.2.4 Ecografia dell'apparato riproduttore

Le modeste dimensioni dell' apparato riproduttore felino fanno sì che la sua indagine ecografica risulti frequentemente difficile da attuarsi, specialmente negli animali di taglia ridotta o che non abbiano mai partorito, ed anche per questo motivo questa tecnica non rientra tra gli esami comunemente svolti ai fini dell'identificazione dell'estro nella gatta. Tuttavia, l'ecografia rimane una delle tecniche diagnostiche più pratiche ed affidabili nella valutazione delle caratteristiche e delle variazioni sia fisiologiche che patologiche del tratto genitale.

L'ovaio può essere caratterizzato da un'immagine ecografica variabile a seconda del momento del ciclo riproduttivo, anche se spesso visualizzarlo può risultare difficoltoso soprattutto se circondato da tessuto adiposo, o per interferenza causata dal gas presente nel tratto intestinale. Durante l'anestro e i primi giorni di proestro esso appare come una struttura piccola, ovoidale, omogeneamente ipoecogena, senza distinzione tra midollare e

corticale, a volte con margini indefiniti. Durante l'estro, invece, possono essere visibili multipli follicoli anecogeni, o l'intero ovaio può apparire iperecogeno per l'elevato numero di piccole cisti. I follicoli di maggiori dimensioni sono caratterizzati da parete sottile, centro anecogeno, e rinforzo di parete posteriore. In diestro possono essere rilevate aree multifocali anecogene, ipoecogene o iperecogene attribuibili ai corpi lutei e ai corpi emorragici; l'ovaio può apparire ovale o multi lobulato.

Per quanto riguarda l'utero, esso è composto da tre strati (mucosa, muscolare, sierosa) e le sue dimensioni possono variare a seconda del numero di gravidanze, della gestazione in atto o di patologie concomitanti. Endometrio e miometrio sono difficilmente differenziabili, così come il lume spesso non risulta apprezzabile, sebbene a volte sia presente un'area centrale moderatamente ecogena dovuta alla presenza di muco, o ipoecogena se si rileva del fluido. Le corna uterine sono lunghe e spesso vengono perse tra il grasso e le anse intestinali. L'aspetto ecografico dell'utero può essere differenziato da quello dell'intestino per la mancanza di peristalsi e di gas e l'assenza della stratificazione tipica del tratto digerente. Durante l'anestro appare come una lunga e solida struttura omogeneamente ipoecogena, adiacente alla superficie dorsale della vescica (ma a volte può spostarsi anche lateralmente ad essa) in sezione longitudinale, con la cervice rappresentata da una piccola linea obliqua iperecogena, oppure come una struttura cilindrica ipoecoica se preso in sezione trasversa (Mattoon e Nyland, 1995).

1.3 METODI CONTRACCETTIVI FARMACOLOGICI: I PROGESTINICI

1.3.1 Generalità

I progestinici sono derivati di sintesi del progesterone e vengono comunemente impiegati in medicina veterinaria per il controllo del ciclo riproduttivo negli animali domestici e sono tuttora l'unica classe di farmaci approvati per l'utilizzo nel gatto. Essi permettono di posporre l'estro temporaneamente (se somministrati poco prima del proestro) o per periodi prolungati (se assunti in anestro), oppure di sopprimere il calore (se si comincia il trattamento dopo l'inizio del proestro) (Romagnoli e Sontas, 2010).

Il loro sviluppo risale agli anni '30, quando si scoprì che se iniettati nella coniglia ne inibivano l'ovulazione. Questo portò ad una serie di studi successivi per la loro

applicazione come contraccettivo in medicina umana, ed inevitabilmente trovarono un impiego in ugual misura anche in ambito veterinario (Evans e Sutton, 1989). Il loro meccanismo d'azione è tuttora in discussione. Si pensa che essi agiscano principalmente esercitando un feedback negativo a livello ipotalamico e ipofisario, inducendo la soppressione della secrezione di GnRH, FSH e LH e di conseguenza la mancata follicologenesi ed ovulazione; tuttavia non si esclude che essi possano andare ad alterare anche la motilità uterina impedendo il trasporto e la fecondazione dell'oocita, o la recettività endometriale impedendo l'impianto (Munson, 2006).

Vengono pertanto clinicamente impiegati come: (1) antigonadotropi, per prevenire l'ovulazione e la formazione di corpi lutei; (2) antiestrogenici, grazie alla soppressione dello sviluppo follicolare e della conseguente produzione di estrogeni; (3) antiandrogenici, nei maschi con disturbi della sessualità; (4) progestageni, per mantenere la gravidanza e le secrezioni endometriali in caso di insufficienza luteinica (Evans e Sutton, 1989).

Tra i composti più comunemente utilizzati si ricordano: medrossiprogesterone acetato (MPA), megestrolo acetato (MA), e i più recenti delmadinone acetato (DMA), clormadinone acetato (CMA), levonorgestrel (LEV), proligestone (PGS) e altrenogest (ALG).

Il **medrossiprogesterone acetato** (17 α -hydroxy-6 α -methylprogesterone acetate) è il primo farmaco storicamente messo a punto per l'uso nella specie umana e largamente sperimentato nella cagna. Questo composto si è rivelato essere molto più potente del progesterone endogeno, e presenta affinità anche per i recettori degli androgeni e dei glucocorticoidi. È efficace sia per la posposizione temporanea che permanente che per la soppressione dell'estro. Per la soppressione permanente viene somministrato intramuscolo (IM) ed ha un'efficacia del 90% se ripetuto ad intervalli di 6 mesi, e del 98% se ripetuto ogni 5 mesi. Per la soppressione temporanea, invece, può essere assunto per via orale. Il ritorno in calore è molto variabile, e può andare da 1 a 26 mesi dopo la sospensione della terapia. È consigliata la somministrazione in anestro ed un trattamento non superiore ai 2 anni (Evans e Sutton, 1989).

Il **megestrolo acetato** (6-methyl-6-dehydro-17 α -acetoxypregesterone) è stato studiato per somministrazioni più brevi (short-acting), in quanto farmaco con metabolismo epatico più rapido rispetto al MPA. Ha un'affinità del 75% per i recettori degli androgeni, e del 37% per quelli dei glucocorticoidi (Briggs, 1973). Ha una buona efficacia se somministrato per os sottoforma di gocce per non più di 12 mesi consecutivi. Può essere somministrato in anestro oppure, se lo scopo è la soppressione dell'estro, è consigliabile iniziare la terapia

nei primi giorni del proestro. Il ritorno in calore dalla sospensione della somministrazione è variabile, ma non raggiunge mai intervalli di 2 anni come il MPA (Evans e Sutton, 1989).

Il **proligestone** (14 α ,17 α -propylidenedioxyprogesterone) è un progestinico di ultima generazione, studiato per ottenere solo l'effetto inibitore sull'asse ipotalamo-ipofisi senza agire su utero, mammella e altri organi bersaglio del progesterone. Sperimentazioni successive hanno dimostrato che questo composto espleta comunque gran parte degli effetti collaterali provocati da MPA e MA, anche se per alcuni di essi forse agisce in maniera più blanda rispetto agli altri due progestinici. Viene somministrato solitamente per via IM o sottocutanea (SC); una seconda iniezione viene fatta dopo 3 mesi dalla prima, la terza dopo 4 mesi dalla seconda ed infine si procede con intervalli di 5 mesi. Può essere somministrato in proestro o in anestro, e a differenza del MA è stato studiato per una soppressione più duratura dell'estro (long-acting): il ritorno in calore infatti si verifica in media dopo 6 mesi (con un range di 3-9 mesi). La fertilità post-trattamento risulta nei limiti della norma (Romagnoli e Sontas, 2010).

1.3.2 Dosaggi ed effetti collaterali

I progestinici sono composti relativamente sicuri, dei quali si conoscono tutti gli effetti, sia voluti che indesiderati, nel cane così come nel gatto. Gli effetti collaterali riportati, tuttavia, sono frutto di studi di tossicità cronica effettuati nella seconda metà del secolo scorso per la commercializzazione dei principi attivi in medicina umana, per cui alle dosi normalmente impiegate nella clinica dei piccoli animali raramente si riscontrano, a meno di errori nella posologia, nella scelta del paziente o di trattamenti molto prolungati (anni). I principali effetti collaterali dovuti ad un uso errato possono essere:

- aumento dell'incidenza di patologie uterine quali iperplasia endometriale cistica, mucometra, piometra e neoplasie;
- aumento dell'incidenza delle patologie mammarie, compresa la formazione di tumori benigni e maligni quali adenomi, carcinomi e adenocarcinomi, e iperplasia mammaria benigna, soprattutto se le gatte vengono trattate prima della pubertà;
- aumento della secrezione dell'ormone della crescita (GH) da parte della ghiandola mammaria e conseguente acromegalia (non riportata nel gatto);

- iperglicemia, glicosuria e diabete mellito, a causa dell'insulino-resistenza indotta dall'eccesso di GH, specialmente nei soggetti con patologia subclinica;
- soppressione adrenocorticale e Cushing secondario dovuto all'azione di tipo glucocorticoide dei progestinici.

Gli effetti osservabili invece dopo la somministrazione di dosi corrette ma nel paziente sbagliato possono essere:

- ritardato inizio del parto (se somministrati in gravidanza);
- mascolinizzazione dei feti femmina (se somministrati nella prima metà della gravidanza, non riportata nel gatto);
- chiusura anticipata delle fisi in animali prepuberi in accrescimento.

Infine, nei pazienti giusti e a dosi adeguate, i progestinici possono comunque provocare lesioni cutanee locali nel punto di inoculo (decolorazione del pelo, alopecia, atrofia cutanea), alterazioni comportamentali (aumento dell'appetito e del peso, calo della libido, letargia e tendenza alla maggiore sedentarietà) e talora una lieve poliuria-polidipsia (Romagnoli e Sontas, 2010).

Occorre tenere in considerazione che gli effetti collaterali possono variare da specie a specie così come tra classi diverse di progestinici (ad esempio nel MPA non è mai stato segnalato un effetto diabetogeno come nel MA).

È consigliabile utilizzarli solo in animali sani, già puberi e che non abbiano anamnesi di cicli irregolari, perdite vulvari o endometriti. Non vanno impiegati in femmine gravide ed è sempre di fondamentale importanza verificare la fase del ciclo riproduttivo cui versa il soggetto prima di trattarlo. Se infatti dovessero essere somministrati in diestro la loro azione si andrebbe a sommare a quella del progesterone endogeno già in circolo, aumentando il rischio di incorrere in effetti collaterali anche gravi. È perciò buona norma, prima di eseguire un trattamento con un qualsiasi progestinico: (1) raccogliere l'anamnesi del soggetto; (2) effettuare un'accurata visita clinica, soffermandosi sulla valutazione dei genitali esterni e la palpazione delle ghiandole mammarie, ed eventualmente perfezionando il quadro generale con esami completi del sangue e delle urine; (3) realizzare uno striscio vaginale, accompagnato da un eventuale dosaggio ormonale per stabilire lo stato riproduttivo; (4) eseguire un'ecografia uterina (Romagnoli, 2015).

Oltre ad una possibile predisposizione soggettiva, è opinione comune che l'incidenza di effetti collaterali conseguenti al trattamento con progestinici sia strettamente correlata alla posologia e alla durata della terapia.

In uno dei primi studi scientifici sull'uso del MPA nei gatti, l'estro è stato soppresso con una dose orale di 0,05 e 0,01 mg/kg somministrata ogni 24 ore per 12 mesi in due gruppi di 6 gatte ciascuno. Nel primo gruppo si è registrata un'efficacia del 100%, nel secondo una sola gatta ha manifestato calore dopo 7 mesi di trattamento. Tutte le gatte sono state riscontrate in buona salute durante lo studio e sono tornate in calore tra i 20 e i 120 giorni dalla sospensione del farmaco. Si è dimostrato un effetto negativo sulla fertilità al primo calore post trattamento (cuccioli piccoli e deboli, morti premature), ma nessuna alterazione della fertilità a lungo termine (Harris e Wolchuk, 1963). Tuttavia, negli anni successivi la maggior parte delle pubblicazioni hanno continuato a proporre dosaggi di gran lunga superiori a quelli minimi studiati in precedenza, come ad esempio iniezioni di 25-100 mg equivalenti a 6,25-25 mg/kg in un gatto di 4 kg (Colton, 1965), o di 20-50 mg/gatto ogni 3-4 mesi per diversi anni (Hernandez et al., 1975); la conseguenza logica è stata l'aumento dell'incidenza degli effetti collaterali quali iperplasia e tumori mammari, finendo per scoraggiarne l'impiego nel gatto.

Nella letteratura relativa al MA, invece, si individuano tre classi di dosaggio: bassa, media e alta. La prima classe prevede la somministrazione di 2,5 mg/gatto/settimana (pari a 0,625 mg/kg/settimana in un gatto di 4 kg) per almeno 30 settimane. Gli effetti collaterali registrati in uno studio su 244 gatte sono stati: aumento dell'appetito (33,6% dei soggetti), del peso (13%) e cambiamenti comportamentali (Oen, 1977). Il dosaggio medio consiste nella somministrazione di 0,625 mg/kg ogni 24 ore per una settimana o ogni 48 ore per due settimane. Sono stati rilevati soppressione surrenalica e diabete mellito, scomparsi tuttavia una volta sospeso il trattamento (Chastain et al., 1981; Middleton et al., 1987). Il dosaggio elevato comprende invece trattamenti di 0,625-1,25 mg/kg/die o 2,5-5,0 mg/kg/settimana per uno o più anni. Tra i numerosi effetti indesiderati riscontrati vi sono lesioni alle ghiandole mammarie (iperplasia, noduli benigni e maligni) (Hinton e Gaskell, 1977; Purkay e Stevenson, 1983; Tomlinson et al., 1984; Hayden et al., 1989; MacDougall, 2003), lesioni uterine (iperplasia endometriale cistica, piometra) (Bellenger e Chen, 1990; Bulman-Fleming, 2008), gravi disordini endocrini (diabete e soppressione surrenalica, tanto da consigliare la sospensione graduale della somministrazione così come avviene per le terapie cortisoniche) (Pukay, 1979; Watson et al., 1989), xantomatosi cutanea

(Kwochka e Short, 1984) e cecità associate a iperlipidemia (Ghaffari, 2008). Queste posologie sono altamente sconsigliate poiché gli effetti a livello endocrino, uterino e mammario risultano avere insorgenza più rapida, severa e sono spesso irreversibili. Recentemente negli USA il MA è stato utilizzato per il controllo della riproduzione nelle colonie feline; in particolare, un veterinario del Connecticut ha deciso di commercializzare un prodotto denominato Feralstat il cui principio attivo era rappresentato dal megestrolo acetato, mischiato a della polvere di lattosio per renderlo più appetibile. La dose utilizzata era quella di 0,1-0,2 mg/kg/settimana (corrispondente a 0,014-0,028 mg/kg/die), la più bassa finora sperimentata nel gatto. Sfortunatamente non ci sono dati pubblicati relativi alle colonie gestite con questo prodotto, anche se informazioni aneddotiche segnalano la buona efficacia di questi bassi dosaggi (Greenberg et al., 2013).

Per quanto riguarda il proligestone, infine, esso è stato commercializzato in Europa per anni con indicazioni posologiche di 100 mg/gatto (o 25-30 mg/kg) da ripetere ogni 5 mesi. In uno studio si è comparata l'efficacia di una somministrazione di 30 mg/kg SC di PRG con una di 25 mg/gatto SC di MA in due gruppi di 15 gatte; la durata dell'effetto contraccettivo del proligestone è stata di approssimativamente 8 mesi contro i 3-5 mesi del MA. Inoltre nessuna modificazione uterina o mammaria è stata rilevata nelle gatte trattate con PRG, mentre due gatte del secondo gruppo hanno sviluppato piometra (Findik et al., 1999). Per il proligestone sono inoltre stati dimostrati anche minori effetti indesiderati nei confronti dell'ACTH (ormone adrenocorticotropo), della glicemia e nessun effetto sull'insulina (Church et al., 1994). Un gatto Maine Coon di 7 mesi ha sviluppato iperplasia mammaria benigna dopo due mesi dal trattamento con 0,75 ml (17,8 mg/kg) di PRG (Vitasek e Dendisova, 2006); in un altro caso, invece, un Burmese di 9 mesi ha manifestato calcinosi circumscripta dopo 4 mesi dell'iniezione di 100 mg PRG per la soppressione dell'estro (O'Brien e Wilkie, 2001).

1.4 SCOPO DELLA TESI

La letteratura riguardante l'utilizzo di progestinici per il controllo del ciclo riproduttivo negli animali domestici è spesso limitata alla sperimentazione sulla cagna, mentre risulta carente di precise informazioni per quanto riguarda il loro impiego nei felini. Vi sono infatti pareri discordanti su quale possa essere la posologia più efficace e sicura per la gatta, così come dati fuorvianti circa il protocollo di utilizzo e l'incidenza di effetti collaterali. Sono inoltre ancora insufficienti gli studi eseguiti sui progestinici di ultima generazione come ad esempio il proligestone.

Il nostro lavoro ha dunque lo scopo di testare due tra i più diffusi prodotti in Italia a base di progestinici, ed in particolare di proligestone (Covinan®, Merck) e di megestrolo acetato (Estropill®, Merck), ad un dosaggio inferiore a quello universalmente riportato in letteratura. L'obiettivo è quello di avvicinarsi alla dose minima efficace e ridurre i rischi per la salute dell'animale. Si andrà a valutare l'intervallo di tempo tra la somministrazione del farmaco ed il ritorno in calore, ed i possibili cambiamenti a carico del comportamento (livello di attività, aggressività, vagabondaggio, interazione col proprietario e altri animali, abitudini alimentari ed eliminatorie, comportamento sessuale), del peso e delle condizioni cliniche generali della gatta trattata. Particolare attenzione sarà rivolta all'apparato riproduttore (ghiandole mammarie, utero e ovaie), sia dal punto di vista macroscopico che microscopico. Si andranno infine a valutare le eventuali modificazioni dei parametri ematobiochimici, su cui non è ancora stato compiuto alcuno studio.

2. MATERIALI E METODI

2.1 ANIMALI COINVOLTI NELLA RICERCA

Lo studio è stato condotto su 10 gatte di proprietà, presentate con la richiesta di controllo farmacologico dell'attività riproduttiva. Sette gatte hanno aderito al gruppo di sperimentazione di proligestone iniettabile (Covinan®, Merck) e tre al gruppo utilizzando megestrolo acetato per uso orale (Estropill®, Merck), sulla base della libera scelta del proprietario. Per poter aderire al progetto tutte le gatte dovevano essere in buone condizioni di salute, post-puberi, intere, non gravide, e non in diestro (il loro livello di progesterone ematico non doveva superare il valore limite prefissato di 1,0 ng/ml).

I due gruppi di animali raccolti sono risultati eterogenei per razza, peso, età e provenienza. La maggior parte dei soggetti era di razza Comune Europea, tranne i soggetti n°1 (Shy) e n°2 (Giulia) che erano rispettivamente di razza Maine Coon e Thai. L'età era compresa tra i 5 mesi e i 7 anni.

Tutte le gatte avevano accesso all'esterno ad eccezione del soggetto n° 7 (Bianchina) e n°10 (Gigia) che vivevano costantemente in appartamento; le gatte n°4 (Micia) e n°8 (Europa) trascorrevano invece la maggior parte della loro giornata fuori casa e rientravano solamente in corrispondenza dei pasti. Per quasi tutte le gatte l'alimentazione era di tipo commerciale (crocchette e umido di marche differenti) e in alcuni casi era associata a cibi casalinghi.

Le gatte Micia (n°4) e Europa (n°8) appartenevano alla stessa proprietaria e convivevano con altri gatti maschi e femmine allo stato semi-brado. La maggior parte dei soggetti conviveva ugualmente con altri gatti (interi o sterilizzati) o altri animali (cani, tartarughe) in maniera pacifica. Solo Eclisse (n°6) e Tequila (n°9) vivevano in casa da sole.

Solamente in metà dei soggetti, ovvero nel n°1 (Shy), n°2 (Giulia), n°5 (Luna), n°9 (Tequila) e n°10 (Gigia), sono stati attuati trattamenti antielmintici e profilassi vaccinale regolare. In tutte le gatte invece venivano eseguiti periodicamente trattamenti antiparassitari ad eccezione della n°4 (Micia), n°7 (Bianchina) e n°8 (Europa), in cui effettivamente è stata riscontrata la presenza di ectoparassiti (pulci) alla prima visita. Nessun animale ha mai sofferto di particolari patologie, tranne Eclisse (n°6) che presentava sordità dalla nascita.

Non tutti gli animali dello studio erano di comprovata fertilità: Maggie (n°3) infatti, secondo la testimonianza della proprietaria, è sempre andata in calore regolarmente ma non ha mai concepito. La gatta si è sempre dimostrata particolarmente aggressiva nei confronti dei maschi, e non sappiamo se l'accoppiamento sia mai realmente avvenuto. La gatta n°6 (Eclisse) e n°10 (Gigia) al momento della visita iniziale avevano appena manifestato il loro primo calore, mentre solamente i soggetti n°4 (Micia) e n°8 (Europa) avevano partorito una volta prima del trattamento. Entrambe sono state coperte più di una volta e hanno dato alla luce rispettivamente a 3 e 2 gattini sani. Tutte le altre gatte hanno sempre manifestato calori regolari della durata di circa 1 settimana nei periodi fertili compresi tra fine inverno/primavera e tarda estate, ma è sempre stato negato loro qualsiasi contatto con gatti maschi.

La raccolta dei dati è iniziata a Gennaio 2015, periodo di inizio della stagione riproduttiva per quasi tutte le gatte dello studio, e si è conclusa a fine Ottobre dello stesso anno. Di seguito è riportata una tabella con i dettagli essenziali del segnalamento di ciascuna gatta inclusa nello studio, il farmaco ad essa somministrato ed il periodo dell'anno in cui è stata trattata (Tabella n°1).

	NUMERO	NOME	RAZZA	ETA'	PESO (kg)	FARMACO	PERIODO TRATTAMENTO
	1	Shy	Maine Coon	10 m	3,0	Covinan®	Giugno 2014
	2	Giulia	Thai	1 a	2,8	Estropill®	Ottobre 2014
	3	Maggie	Comune Europea	7 a	3,3	Covinan®	Gennaio 2015
	4	Micia	Comune Europea	2 a	3,3	Covinan®	Gennaio 2015
	5	Luna	Comune Europea	9 m	3,7	Covinan®	Gennaio 2015
	6	Eclisse	Comune Europea	5 m	2,4	Covinan®	Febbraio 2015
	7	Bianchina	Comune Europea	8 m	4,2	Covinan®	Marzo 2015
	8	Europa	Comune Europea	1 a 9 m	3,0	Covinan®	Marzo 2015
	9	Tequila	Comune Europea	2 a	2,7	Estropill®	Marzo 2015
	10	Gigia	Comune Europea	7 m	3,1	Estropill®	Marzo 2015

Tabella n°1 - Segnalamento (numero, nome, razza, peso, età, tipo di prodotto utilizzato e periodo del trattamento) di 10 gatte domestiche trattate con proligestone (Covinan®, Merck) e megestrolo acetato (Estropill®, Merck).

2.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

Il protocollo sperimentale prevedeva una prima visita di valutazione ed esame del candidato per decidere se accettarlo o meno nella ricerca; i soggetti inclusi nello studio sono quindi stati sottoposti ad una seconda visita ad un mese di distanza dall'inizio del trattamento con il farmaco progestinico, una terza visita a tre mesi di distanza ed infine una quarta visita effettuata una volta constatata la cessazione dell'effetto del prodotto ed il ritorno in calore (compresa tra i 4 e i 9 mesi post-trattamento).

La prima visita comprendeva le seguenti procedure:

- Raccolta di anamnesi e segnalamento;
- Esame obiettivo generale ed esame obiettivo particolare dell'apparato riproduttore;
- Sedazione (se necessaria);
- Prelievo di sangue per ematobiochimico completo e dosaggi ormonali;
- Colpocitologia;
- Ecografia dell'apparato riproduttore;
- Somministrazione del farmaco;
- Questionario comportamentale.

A. ANAMNESI E SEGNALAMENTO

Alla prima visita è stato delineato un quadro generale della storia passata della gatta tramite un'anamnesi ambientale, individuale e riproduttiva. Si è interrogato il proprietario circa l'età, la razza e la provenienza della gatta, la convivenza con altri animali, lo stato di vaccinazione e profilassi per endo- ed ectoparassiti, e l'uso dell'animale (da compagnia o adibito a carriera riproduttiva). Si sono inoltre raccolte informazioni sullo stato riproduttivo (calori, accoppiamenti, parti), eventuali malattie e terapie farmacologiche in atto o pregresse.

È stato infine fatto firmare al proprietario un consenso informato, dopo aver accuratamente spiegato tutte le procedure previste dal protocollo, il tipo di farmaco che si intendeva testare, i suoi meccanismi d'azione e gli eventuali possibili effetti desiderati ed indesiderati.

B. VISITA CLINICA

Lo scopo principale della visita clinica era quello di constatare lo stato di buona salute del soggetto candidato alla sperimentazione, indispensabile prima di qualsiasi trattamento con progestinici. L'animale è stato pesato ed è stato effettuato un esame obiettivo generale che prendeva in considerazione:

- Sviluppo scheletrico e costituzione;
- Stato di nutrizione e tonicità muscolare;
- Stato del sensorio;
- Segni ed atteggiamenti particolari;
- Cute e sottocute;
- Mucose apparenti;
- Linfonodi esplorabili;
- Temperatura;
- Polso;
- Respiro;
- Grandi funzioni organiche.

È stato poi eseguito un esame obiettivo particolare dell'apparato riproduttore che comprendeva un'accurata ispezione dei genitali esterni (integrità e regolarità della regione perineale e delle labbra vulvari, colore delle mucose, eventuale presenza di iperemia, muco, scolo, lesioni o anomalie varie) e l'ispezione e palpazione delle ghiandole mammarie toraciche, addominali e inguinali con la gatta posta in decubito dorsale o in stazione quadrupedale, per escludere la presenza di noduli o iperplasia del parenchima ghiandolare. Non è stato possibile misurare il diametro della ghiandola mammaria, e ci si è dovuti affidare principalmente ad una valutazione visiva e tattile.

C. SEDAZIONE

A seconda dell'indole del soggetto, è stata eseguita o meno una blanda sedazione ai fini di evitare inutile stress e sofferenza all'animale, e permettere allo stesso tempo un approccio più sicuro da parte dell'operatore. Pertanto, laddove necessario, è stato impiegato un oppioide associato ad un anestetico dissociativo e un $\alpha 2$ agonista, il tutto somministrato IM

con una siringa da 1 ml (Pic Indolor®, Artsana). I dosaggi sono stati i seguenti: butorfanolo 0,2 mg/kg + ketamina 2 mg/kg + dexmedetomidina 0,7 µg/kg. Questa associazione ha permesso di assicurare sedazione, analgesia e scomparsa della reattività agli stimoli esterni. Dopo l'iniezione, si sono attesi circa 5-10 minuti prima di manipolare l'animale, lasciandolo in tranquillità nel trasportino ed eventualmente coprendolo con un panno, per non ostacolare l'instaurarsi dell'azione sedativa, soprattutto in quei soggetti che si presentavano particolarmente agitati. La durata complessiva dell'effetto sedativo è stata di circa 20-30 minuti.

Dove si è ritenuto necessario, si è integrata la sedazione con la somministrazione di ossigeno "flow-by" durante le varie procedure per prevenire un eventuale stato di ipossia. Laddove le procedure sono state portate a termine in un tempo inferiore alla durata dell'effetto sedativo, si è contribuito ad accelerare il risveglio dell'animale tramite somministrazione intra-muscolare di atipamezolo (Antisedan®, Pfizer), antagonista selettivo degli α₂ agonisti, a dose pari alla metà della dose di dexmedetomidina iniettata in precedenza.

D. PRELIEVO DEL SANGUE

Il prelievo del sangue è stato necessario per la valutazione dei parametri emocromocitometrici e biochimici (e confermare quindi le condizioni di buona salute del soggetto), nonché per il dosaggio del progesterone e degli estrogeni (questi ultimi analizzati dalla seconda visita in poi). È stato richiesto ai proprietari di portare il gatto possibilmente a digiuno da almeno 8-12 ore.

Il prelievo è stato effettuato dalla vena giugulare, ponendo il gatto in decubito sternale con testa sollevata e distesa. È stata eseguita la tricotomia della zona designata e la disinfezione con un primo passaggio di Betadine® (Medifarm) ed un secondo passaggio con alcol. Dopo aver fatto compressione a monte della vena, si è introdotta una siringa da 2,5 ml 0,70x0.30 mm con ago 22 G x 1 1/4" (PIC Indolor®, Artsana) e si sono prelevati 3-4 ml di sangue, inseriti poi in parte in una provetta sterile sottovuoto (BD Vacutainer®) senza anticoagulante, destinata alla centrifugazione e allo stoccaggio del siero per l'esame biochimico ed il dosaggio ormonale, e in parte in una provetta con EDTA (BD Vacutainer®) per l'esame emocromocitometrico senza striscio. In caso di mancata riuscita del prelievo dalla vena giugulare, esso è stato eseguito in altre sedi quali la vena cefalica o

safena. In questi due casi, considerando il minor diametro dei vasi, si è preferito utilizzare un ago butterfly da 0,80x19 mm o un ago 21 G (PIC Indolor®, Artsana).

Tutti i campioni sono stati contrassegnati con i dati del proprietario, del gatto e la data del prelievo, e portati in laboratorio, accompagnati dalla richiesta del tipo di esame da eseguire. La provetta con EDTA, dopo avervi inserito il sangue, è stata delicatamente capovolta più volte per un minuto per permettere all'anticoagulante di distribuirsi uniformemente in tutto il campione. La provetta priva di EDTA è stata invece lasciata riposare in posizione verticale per circa 15 minuti per favorire la coagulazione del campione, quindi centrifugata per 5 minuti a 3500 giri/minuto (1500 x g) per la sedimentazione del coagulo e la separazione della fase liquida. Il siero è stato quindi prelevato con una pipetta monouso e stoccato in una provetta Eppendorf da 1,5 ml. Le analisi ematobiochimiche sono state eseguite il giorno successivo al prelievo, mentre le aliquote di siero rimanenti sono state stoccate in congelatore ad una temperatura di -20°C fino al momento del dosaggio degli ormoni (eseguito per tutti i campioni contemporaneamente al termine della prova). Solamente alla prima visita il progesterone è stato dosato lo stesso giorno del prelievo, in quanto la conoscenza del suo valore preciso era di fondamentale importanza per procedere o meno con il trattamento progestinico.

Il dosaggio ormonale è stato eseguito tramite prove diagnosticabili in vitro con l'analizzatore Immulite (DPC Diagnostic Product Corporation, 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 sfere di polistirene coartate con l'anticorpo specifico per l'ormone da testare, poste all'interno di questa particolare provetta di reazione. Qui avvengono la reazione immunologica ormone-anticorpo, 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 (ormone) originariamente presente nel campione di siero. L'operazione di dosaggio prevede che i campioni di siero vengano caricati su di una piattaforma a catena continua all'interno di piccoli calici ai quali sono stati applicati dei codici a barre, e intervallati dalle 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 substrato legato da quello libero, e il liquido espulso viene convogliato in una camera laterale. 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 ad 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. Un tubo fotomoltiplicatore consente la misurazione dell'entità dell'emissione luminosa tramite il conteggio dei fotoni. Tali valori vengono convertiti in concentrazione analitica usando curve standard memorizzate.

E. COLPOCITOLOGIA

La valutazione della citologia vaginale, affiancata dal dosaggio ormonale, ha permesso di determinare più o meno accuratamente la fase del ciclo riproduttivo cui versava la gatta analizzata.

La gatta è stata tenuta da un aiutante per la cute della nuca e posta in decubito sternale mentre le si afferrava la coda e si elevava il posteriore mostrando la regione perineale. Quindi si sono divaricate delicatamente le labbra vulvari e si è introdotto nel vestibolo vaginale un tamponcino di cotone sterile imbevuto di soluzione fisiologica, spingendolo in profondità per 2-3 cm lungo la porzione dorsale della vagina. Una volta estratto, il tampone è stato fatto rotolare 2 o 3 volte su di un vetrino e, dopo esser stato lasciato essiccare all'aria, colorato con la metodica Diff-Quick (Diff-Quick®, Dade Behring). Il vetrino è stato immerso prima in un fissativo, poi in due coloranti (eosina ed ematossilina) per un totale di 5 immersioni ciascuno (ognuna della durata di pochi secondi), ed infine, una volta lavato l'eccesso di colore, lasciato asciugare all'aria.

Ciascun preparato è stato osservato al microscopio ottico ad ingrandimento 10x e 40x (ingrandimento dell'oculare: 10x), e ne è stata prodotta documentazione fotografica. Dopo una valutazione generale della cellularità e della morfologia citologica predominante, di ogni vetrino sono state contate 100 cellule epiteliali in buono stato di conservazione per

poter estrapolare la percentuale di cellule parabasali, intermedie e cheratinizzate, e riuscire quindi a collocare approssimativamente la gatta in una delle possibili fasi del ciclo estrale.

F. ECOGRAFIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE

Si è scelto di affiancare questo esame al resto delle procedure per escludere patologie uterine subcliniche ed eventuali stati di gravidanza, in modo da poter selezionare solamente i candidati più idonei per la sperimentazione, e per poter monitorare qualsiasi modificazione patologica e non a carico degli organi genitali nel corso dello studio.

La gatta è stata sedata solo in quei casi in cui questa procedura si era rivelata fonte di stress insostenibile per l'animale. Quindi è stata posta in decubito dorsale, o eventualmente laterale o in stazione. La regione ventrale è stata tricotomizzata o, laddove il proprietario si fosse dimostrato contrario, semplicemente bagnata con dell'alcol prima di applicare il gel acustico. L'ecografo utilizzato era di tipo Z.One PRO Ultrasound System (Zonare®, Medical System, Genova) e si sono impiegate sonde lineari e convex ad alta frequenza variabile tra i 7,5 e i 10 MHz. Le sonde sono state appoggiate tra le due linee mammarie nella regione addominale-pubica, con il fascio ultrasonoro diretto in direzione ventro-dorsale. Come punti di riferimento per rintracciare il tratto riproduttivo sono stati utilizzati il polo caudale del rene per identificare l'ovaio, e la vescica (meglio se mediamente repleta) per l'utero. Di quest'ultimo in particolare si sono valutati il diametro e la forma delle corna (rettilinee, curve o spiralate) tramite scansioni longitudinali e trasverse dell'organo, la stratigrafia specialmente dello strato più interno (liscio o irregolare) ed il lume (con il suo eventuale contenuto liquido e non).

G. SOMMINISTRAZIONE DEL FARMACO

Solo dopo aver constatato la buona salute, lo stato riproduttivo idoneo (escludendo gatte gravide o in diestro), e aver confermato che la concentrazione sierica di P4 ricadesse entro il valore limite designato ($< 1,0$ ng/ml), si è potuti procedere con la somministrazione del farmaco.

Per quanto riguarda il proligestone (Covinan®, Merck), è stata eseguita un'unica iniezione sottocutanea (SC) di 20 mg/kg con una siringa da 1 ml (PIC Indolor®, Artsana). Il flacone presentava una concentrazione di 100 mg/ml perciò con gatti di peso compreso tra i 3 e i 4 kg si sono iniettati approssimativamente 60-80 mg e dunque 0,6-0,8 ml ciascuno. In tutte le gatte l'iniezione è stata effettuata nella regione interscapolare; solamente nel soggetto n°4 (Micia) il farmaco è stato iniettato nel sottocute della coscia destra per comodità di somministrazione.

Il megestrolo acetato (Estropill®, Merck) è stato invece somministrato alla dose di 5 gocce/kg/die (pari a circa a 0,010-0,012 mg/kg/die di principio attivo) per 6-10 settimane consecutive. Il proprietario ha potuto scegliere, in base alle sue esigenze e preferenze, se somministrare la quantità prescritta di farmaco giornalmente, oppure 1-2 volte a settimana, andando quindi a sommare il n° di gocce relative alla totalità dei giorni di trattamento accumulati (ad esempio in una gatta di 3 kg si sono potute somministrare 15 gocce al giorno oppure 105 gocce/settimana). Ha potuto inoltre liberamente decidere se somministra il farmaco al proprio animale direttamente in bocca (grazie all'apposito tappo contagocce) o miscelato con il cibo.

Sia durante l'iniezione di proligestone che nella somministrazione di gocce di megestrolo acetato è stato consigliato all'operatore così come al proprietario l'utilizzo di guanti, in quanto l'assorbimento dei progestinici è riportato possa avvenire in minima parte anche per via transcutanea.

H. QUESTIONARIO COMPORTAMENTALE

Al fine di monitorare il comportamento di ogni soggetto nel corso dello studio, è stato formulato un modulo etologico da consegnare al proprietario, riportato nella sezione "Allegati" (Allegato n°1).

Il questionario prendeva in considerazione diversi parametri quali:

- Indole dell'animale;
- Abitudini alimentari ed eliminatorie (tipo, quantità e modalità di assunzione del cibo assunto, tipologia e frequenza di feci e urine);
- Comportamento di marcatura (graffiature, vocalizzazioni, marcature facciali);

- Comportamento sessuale (atteggiamenti di calore, accoppiamenti, parti);
- Livelli di attività, ore di sonno, esplorazione del territorio, caccia e gioco;
- Aggressività e socializzazione con il proprietario e/o altri animali.

È stata utilizzata una scala numerica (generalmente da 1 a 3) per definire la frequenza dei vari atteggiamenti (ad esempio “frequenza di minzione”: 1= una volta; 2= due o tre volte; 3= più di tre volte; ns= non so), di volta in volta adattata al parametro preso in considerazione, ed una scala descrittiva per delineare i parametri non quantificabili (ad esempio “indole”: da “depresso”, “sedentario” a “iperattivo”, “aggressivo”).

2.3 CONTROLLI SUCCESSIVI

Tutte queste procedure sono state ripetute sistematicamente ad ogni visita di controllo successiva (tranne che per la somministrazione del farmaco), per evidenziare qualsiasi modificazione fisica, riproduttiva e comportamentale dell'animale. Particolare attenzione è stata dedicata al peso dell'animale, all'ispezione del sito di iniezione del prodotto (per le gatte trattate con proligestone iniettabile) e all'esame completo dell'apparato riproduttore. Anche il questionario etologico è stato riconsegnato ai proprietari ad ogni visita, chiedendo loro di riportare, sulla base delle loro impressioni, qualsiasi variazione anche minima in ognuno degli ambiti comportamentali considerati.

Dalla seconda visita in poi, inoltre, è stato aggiunto un test di stimolazione con un agonista del GnRH per valutare il grado di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e di conseguenza l'efficacia del farmaco. Sono stati quindi iniettati SC 0,5 ml di Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet) (pari a 50 µg di GnRH) con una siringa da 1 ml (PIC Indolor®, Artsana) due ore prima del prelievo del sangue, e dosate le concentrazioni sieriche di estradiolo e progesterone. Se all'ultima visita l'animale era già tornato in calore non è stato necessario eseguire il test di stimolazione, ma sono stati ugualmente dosati i due ormoni.

Calcolo dell'intervallo trattamento-ritorno in calore

La stima dell'intervallo trattamento-ritorno in calore è stata effettuata calcolando i giorni intercorsi tra la data della prima somministrazione del progestinico (corrispondente al giorno dell'iniezione di proligestone nelle gatte trattate con Covinan®, Merck, o al giorno di

inizio della somministrazione di gocce di megestrolo acetato nei soggetti sottoposti a terapia con Estropill®, Merck) e la data indicativa in cui l'animale ha ricominciato a manifestare i segni tipici dell'estro. Quest'ultima informazione è stata fornita dal proprietario stesso, dopo essere stato accuratamente istruito su come riconoscere le manifestazioni del calore nella gatta.

Nel caso delle gatte trattate con megestrolo acetato, si è andata a calcolare, oltre alla durata totale dell'effetto contraccettivo del farmaco, anche l'intervallo di tempo intercorso tra la fine della somministrazione e le prime manifestazioni estrali.

Ovarioisterectomia ed istologia

All'ultima visita, una volta terminato l'effetto del farmaco e aver determinato l'intervallo trattamento-calore, il proprietario è stato libero di scegliere se sottoporre il proprio animale alla sterilizzazione chirurgica. Nei soggetti i cui proprietari hanno aderito a questa possibilità (soggetto n°4, 5, 6, 7, 8 e 10) è stata praticata un'ovarioisterectomia.

L'intervento è stato eseguito sotto anestesia generale gassosa con isofluorano (Isoflo®, Esteve), in seguito ad induzione con 2 mg/kg di propofol (Propofol Kabi®, Fresenius Kabi) per via endovenosa. Dopo tricotomia e disinfezione chirurgica della regione addominale, si è effettuata una laparotomia esplorativa lungo la linea alba. È stata praticata la legatura con filo PDS II® (Ethicon) 2-0 monofilamento assorbibile delle arterie ovariche e del corpo uterino a livello dell'ostio cervicale interno. L'intero tratto riproduttore è stato quindi reciso, estratto dall'addome e messo a fissare in formalina (formaldeide in soluzione 10%). Il campione è stato quindi identificato con un numero di referto ed inviato al laboratorio di anatomia patologica per la valutazione istologica. Le gatte sono state trattate con terapia antibiotica (20 mg/kg amoxicillina-acido clavulanico) ed antinfiammatoria (0,05 mg/kg meloxicam), e riconsegnate al proprietario il giorno stesso.

L'utero fissato in formalina è stato quindi incluso in paraffina, e sono state prodotte numerose sezioni ultrasottili dell'organo con un microtomo. Una volta allestiti i vetrini, si sono colorati con ematossilina-eosina e valutati al microscopio ottico ad ingrandimento 4x, 10x e 40x (ingrandimento dell'oculare: 10x). L'epitelio luminale è stato classificato in: singolo, pseudostratificato o iperplastico; lo strato subepiteliale è stato valutato per l'eventuale presenza di emorragie o macrofagi contenenti emosiderina, mentre lo strato

ghiandolare in base al grado di secrezione e dilatazione, di proliferazione e di formazioni cistiche.

Anche il parenchima ovarico è stato analizzato in termini di atrofia/ipertrofia, presenza di follicoli, corpi lutei, cisti, o altre anomalie di varia natura.

2.4 ANALISI DEI DATI

I dati raccolti durante le varie visite di controllo sono stati analizzati in maniera descrittiva producendo un database complessivo con il software Microsoft® Office Excel® 2007 e usufruendo di tabelle Pivot e grafici a dispersione; in particolare, per i parametri quali il peso, la concentrazione media di progesterone ed estradiolo e la percentuale di cheratinizzazione cellulare, è stata valutata la possibile correlazione tra queste variabili e le classi di distanza dal trattamento tramite regressione lineare e valutato il coefficiente di determinazione (R^2).

Anche per i dati relativi ai questionari etologici si è svolto uno studio puramente descrittivo, andando a valutare le variazioni della frequenza di manifestazione delle diverse tipologie comportamentali analizzate nel singolo soggetto.

Si è poi analizzata una parte dei dati con la procedura GLM del software SigmaStat 2.03 attraverso ANOVA a due vie, prendendo come variabili indipendenti il gruppo di trattamento (gatte trattate con proligestone o con megestrolo acetato) e la classe di distanza dal trattamento (CLASSE 1: tempo 0, corrispondente alla prima visita; CLASSE 2: da 0 a 90 giorni post-trattamento, comprendente la seconda visita di controllo; CLASSE 3: >90 giorni dalla prima somministrazione, comprendente la terza ed eventuale quarta visita). Come variabili dipendenti sono stati considerati la variazione del peso, dei parametri ematici e ormonali, i diametri uterini e le percentuali delle tipologie cellulari dell'epitelio vaginale. Le significatività sono state valutate attraverso il test di Tukey con una $P < 0,05$.

Per quanto riguarda l'estradiolo, non essendo stata eseguita la titolazione dell'ormone alla prima visita, si sono considerate solamente le variazioni relative alla seconda e terza classe di distanza.

3. RISULTATI

3.1 VISITA CLINICA

Per ogni animale sono state eseguite dalle tre alle quattro visite di controllo, a seconda del tipo di studio cui hanno aderito e dell'intervallo trattamento-ritorno in calore. Quasi tutti i proprietari si sono dimostrati in grado di riconoscere i segni dell'estro e di identificare il momento in cui il proprio animale è diventato pubere o è ritornato in calore. Solo il proprietario del soggetto n°10 (Gigia) sosteneva di non aver ancora rilevato cambiamenti comportamentali evidenti riguardanti l'attività riproduttiva, mentre alla prima visita la percentuale di cellule cheratinizzate dello striscio vaginale della gatta aveva dimostrato la presenza di un probabile inizio di fase estrale.

Il soggetto n°3 (Maggie), scappata di casa a luglio e non più rientrata, non ha potuto essere sottoposta alla quarta e ultima visita dopo 6 mesi dal trattamento. La gatta n°7 (Bianchina) è stata invece sterilizzata dopo un mese dall'inizio della terapia per aver sviluppato piometra, e ha eseguito quindi solo due visite. Infine anche per i soggetti n°1 (Shy) e n°2 (Giulia) è stato possibile effettuare solamente due visite di controllo.

Esame obiettivo generale

Dal momento che sono stati reclutati per lo studio solamente animali sani o per lo meno privi di patologie clinicamente rilevabili, alla prima visita tutte le gatte apparivano in buono stato di salute.

Lo sviluppo scheletrico è stato giudicato buono in tutti i soggetti (tranne che per la gatta n°8, Europa, di costituzione piuttosto esile), così come lo stato di nutrizione e tonicità muscolare. Non sono mai stati rilevati segni o atteggiamenti particolari (è stato segnalato dal proprietario che Eclisse, soggetto n°6, presentava sordità congenita), e lo stato del sensorio era decisamente vigile per tutte le gatte. La gatta n°3 (Maggie), n°6 (Eclisse), n°9 (Tequila) e n°10 (Gigia) si sono spesso rivelate piuttosto incuriosite ed interattive nei confronti dell'ambiente e degli operatori, mentre Micia (n°4) per la maggior parte delle visite ha manifestato una certa aggressività. Cute e sottocute sono sempre stati rilevati sufficientemente elastici, le mucose rosee e il TRC (tempo di riempimento capillare) accettabile (< 2 secondi). La gatta n°4 (Micia) e n°8 (Europa) alla prima visita

presentavano pelo opaco e secco, e notevole infestazione da ectoparassiti (pulci); è stato applicato un antiparassitario spot-on (Frontline®, Merial) e consigliata al proprietario una profilassi regolare mensile. Alle visite successive si è riscontrato un notevole miglioramento della lucentezza del pelo e l'assenza di parassiti. Il soggetto n°9 (Tequila), invece, presentava una moderata desquamazione (forfora) principalmente a livello della regione cervicale e del dorso, senza particolare arrossamento o irritazione della cute, accompagnata da un'abbondante perdita di pelo, imputabile probabilmente al tipo di alimento commerciale. È stato suggerito un cambio di alimentazione con mangimi di migliore qualità o ipoallergenici (al pesce) e alle visite successive si è potuta confermare la scomparsa delle squame ed il miglioramento delle condizioni generali della pelliccia.

Non è mai stata riscontrata alcuna linfomegalia. Temperatura (range di normalità nel gatto: 38,5-39°C), polso (a riposo: 80-120 bpm, battiti per minuto) e respiro (a riposo: 15-25 atti respiratori/minuto) sono rientrati nei limiti della norma, tenendo conto di volta in volta del grado di agitazione dell'animale. Le grandi funzioni organiche non si sono potute verificare in ambito ambulatoriale e ci si è basati sulla testimonianza del proprietario; ad ogni modo, appetito ed emissione di feci e urine sono sempre state riportate essere nella norma.

Durante tutta la sperimentazione le condizioni cliniche si sono mantenute pressoché identiche, ad eccezione di alcuni episodi isolati di rilevanza clinica più o meno importante.

Europa (n°8) presentava una lieve sintomatologia respiratoria alla prima visita, con scolo oculare e rinite con piccole erosioni a livello nasale e scolo siero-ematico. Dopo attenta auscultazione polmonare e aver constatato la normalità del murmure vescicolare, si è confinato il problema a livello di vie aeree superiori. Il tutto si è risolto spontaneamente in una settimana.

Eclisse (n°6) presentava alla prima visita una leggera iperemia gengivale riconducibile alla perdita imminente dei denti decidui, e una lieve dolorabilità all'arto posteriore destro, probabile trauma di natura sconosciuta. L'arto non si presentava edematoso in alcun punto, ed essendo la dolorabilità evocata alla palpazione di modesta entità, si è deciso di non intervenire farmacologicamente; il tutto si è infatti risolto spontaneamente in pochi giorni. In aprile la gatta è scappata di casa ed è rientrata solamente dopo una settimana manifestando dolorabilità al treno posteriore, anuria e paralisi della coda (probabile trauma da investimento). Si è esclusa la presenza di fratture tramite un Rx e si è tenuto sotto monitoraggio l'animale per qualche giorno, sotto terapia antiinfiammatoria e antidolorifica.

In pochi giorni sia la minzione che la mobilità della coda sono ritornate normali e la gatta si è ristabilita completamente.

Tequila (n°9) ha sempre presentato un leggero scolo oculare sieroso-mucoso, in particolare dall'occhio destro, con arrossamento della congiuntiva; queste condizioni sono tuttavia migliorate nel corso delle visite di controllo seguenti. I polmoni all'auscultazione sono sempre risultati nella norma. All'ultimo controllo il pelo era lucido, privo di forfora, e lo scolo oculare notevolmente ridotto o assente.

Infine Bianchina (n°7) ha sviluppato piometra dopo un mese dalla somministrazione di proligestone. Dall'esame obiettivo generale svolto durante la visita non si sono potuti rilevare segni di abbattimento o particolare malessere: la gatta era vigile, ben idratata, con temperatura, polso e respiro entro i limiti della norma. La diagnosi di piometra è stata emessa dopo accertamento tramite ecografia uterina e analisi dello striscio vaginale. La gatta è stata operata (eseguendo un'ovarioisterectomia) il giorno stesso e tenuta in degenza per una notte, sotto terapia antibiotica (amoxicillina-acido clavulanico), antinfiammatoria (meloxicam) e antidolorifica (metadone). Il giorno seguente è stata riconsegnata alla proprietaria e si è ristabilita completamente in breve tempo.

Ad ogni visita di controllo si è inoltre prestata particolare attenzione all'ispezione del punto di inoculo negli animali trattati con proligestone in base alla conoscenza dei possibili effetti collaterali a carico del pelo o della cute tratti dalla letteratura. In nessuno degli animali è stata riscontrata atrofia cutanea, alopecia né granulomi. Solamente nel soggetto n°4 (Micia) all'ultima visita di controllo si è notata un'area circolare del diametro di 1,5-2 cm di decolorazione del pelo (da nero è passato a color rame) sulla coscia destra, in corrispondenza del punto di iniezione del farmaco (Figura n°3). L'animale verrà monitorato nei prossimi mesi per valutare se si tratta di un fenomeno a lungo termine o transitorio.

Nella Tabella n°2 sono state inserite le principali voci dell'esame obiettivo generale e i rispettivi risultati ottenuti ad ogni visita di controllo per ciascuna gatta appartenente allo studio.



Figura n°3 - Area di decolorazione del pelo in corrispondenza del punto di inoculo di 20 mg/kg di proligestone (Covinan®, Merck) sulla coscia destra del soggetto n°4 (Micia).

GATTA 1 (Shy) PRG	Sviluppo scheletrico e muscolare	Stato del sensorio	Segni e atteggiamenti particolari	Cute/sottocute	Mucose apparenti	Linfonodi esplorabili	Temperatura (°C)	Frequenza cardiaca (bpm)	Frequenza respiratoria (atti/min)
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,8	-	-
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	-	124	68
GATTA 2 (Giulia) MA									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,7	148	-
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	37,8	120	38
GATTA 3 (Maggie) PRG									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	128	24
SECONDA VISITA	Buono	Vigile, interattiva	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,1	120	44
TERZA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,3	130	52
GATTA 4 (Mcia) PRG									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	120	25
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	140	40
TERZA VISITA	Buono	Vigile, aggressiva	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	130	50
QUARTA VISITA	Buono	Vigile, aggressiva	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,2	72	20
GATTA 5 (Luna) PRG									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,9	144	50
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	156	56
TERZA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	186	64
QUARTA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,4	134	52
GATTA 6 (Eclisse) PRG									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile, interattiva	Sordità	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,4	140	32
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Sordità	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,4	144	48
TERZA VISITA	Buono	Vigile	Sordità	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	132	36
QUARTA VISITA	Buono	Vigile, interattiva	Sordità	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	112	100

GATTA 7 (Bianchina) PRG									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	140	35
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,9	150	40
GATTA 8 (Europa) PRG									
PRIMA VISITA	Sufficiente/buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,7	140	40
SECONDA VISITA	Sufficiente/buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	108	36
TERZA VISITA	Sufficiente/buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,6	112	52
QUARTA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	37,3	80	25
GATTA 9 (Tequila) MA									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,3	120	52
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,4	170	52
TERZA VISITA	Buono	Vigile, interattiva	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	156	52
GATTA 10 (Gigia) MA									
PRIMA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,6	160	48
SECONDA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	170	35
TERZA VISITA	Buono	Vigile	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,5	148	56
QUARTA VISITA	Buono	Vigile, interattiva	Nessuno	Elastici	Rosee, TRC < 2"	Normali	38,4	120	80

Tabella n°2 - Esame obiettivo generale delle 10 gatte appartenenti allo studio e trattate con proligestone (Covinan®, Merck) o megestrolo acetato (Estropill®, Merck). Per ciascun soggetto sono stati riportati i parametri delle varie voci dell'eog registrati alla prima visita, prima della somministrazione del farmaco, e i valori degli stessi parametri misurati alla seconda visita di controllo (a 1 mese di distanza dalla prima), alla terza visita (a tre mesi di distanza) e alla quarta visita (effettuata dopo il ritorno in calore, compresa tra i 4 e i 9 mesi dal trattamento). La sigla "PRG" e "MA" posta di fianco al nome del soggetto indica quali gatte sono state trattate rispettivamente con proligestone o con megestrolo acetato.

Peso

In certi soggetti si è notata una moderata tendenza all'aumento del peso. L'aumento più importante si è registrato nel soggetto più giovane, la gatta n°6, che da 2,4 kg è passata a 3,4 kg misurati all'ultima visita circa 5 mesi dopo la somministrazione del farmaco, pari ad un incremento del 41,7% rispetto al valore iniziale. Le gatte n°1, 2, 3 e 10 sono invece aumentate rispettivamente del 17,2%, 7,1%, 6,1% e 22,6%.

In altri casi, invece, il peso si è mantenuto pressoché stabile (gatta n°8), mentre per le gatte n°5 e n°7 è addirittura diminuito: Luna (n°5) ha visto un'iniziale diminuzione da 3,7 kg a 3,1 kg dopo tre mesi dal trattamento (circa -16,2% del peso iniziale) per poi riaumentare fino a 3,4 kg alla quarta e ultima visita (diminuzione media: 9%); Bianchina (n°7) ha perso invece il 4,8% del suo peso di partenza. Anche la gatta n°4 (Micia) è diminuita sensibilmente dopo tre mesi dall'iniezione di proligestone (da 3,3 kg è arrivata a 2,9 kg: -12%), per poi aumentare nuovamente fino a raggiungere i 3,45 kg all'ultimo controllo (+4,5% del peso iniziale). Tequila (n°9), infine, è aumentata di peso nei primi tre mesi post trattamento (+18,5%), per poi riacquistare quello originario (2,7 kg), misurato all'ultima visita di controllo effettuata dopo circa 7 mesi dalla prima somministrazione del farmaco.

Lo studio della regressione lineare ha dimostrato la mancanza di correlazione tra le due variabili “peso” e “tempo dal trattamento”, sia per il gruppo di gatte trattate con proligestone che con megestrolo acetato ($R^2 < 0,4$). Anche l'analisi statistica eseguita con il test ANOVA non ha rilevato alcuna differenza significativa tra le medie del peso misurate alle varie classi di distanza del trattamento, né per il gruppo di gatte che hanno assunto proligestone, né per quello del megestrolo acetato.

Nella Tabella n°3 sono riportati i pesi di ciascuna gatta misurati ad ogni visita di controllo, mentre nel Grafico n°1 e n°2 è possibile visualizzarne la distribuzione nei soggetti trattati rispettivamente con proligestone e megestrolo acetato nell'arco delle quattro visite effettuate.

SOGGETTO	Peso prima visita (kg)	Peso seconda visita (kg)	Peso terza visita (kg)	Peso quarta visita (kg)
N°1 (Shy)	2,9	-	-	3,4
N°2 (Giulia)	2,8	3,0	-	-
N°3 (Maggie)	3,3	3,6	3,5	-
N°4 (Micia)	3,3	3,5	2,9	3,4
N°5 (Luna)	3,7	3,6	3,1	3,4
N°6 (Eclisse)	2,4	2,8	3,3	3,4
N°7 (Bianchina)	4,2	4,0	-	-
N°8 (Europa)	3,0	3,1	3,1	3,1
N°9 (Tequila)	2,7	2,8	3,2	2,7
N°10 (Gigia)	3,1	3,3	3,5	3,8

Tabella n°3 - Peso di 10 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (gatta n°1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (gatta n°2, 9, 10), registrato alla prima visita (tempo 0), alla seconda (1 mese dopo il trattamento), alla terza (circa tre mesi dopo) e alla quarta visita di controllo (compresa tra i 4 e i 9 mesi dalla somministrazione del farmaco, in base al ritorno in calore di ciascuna gatta).

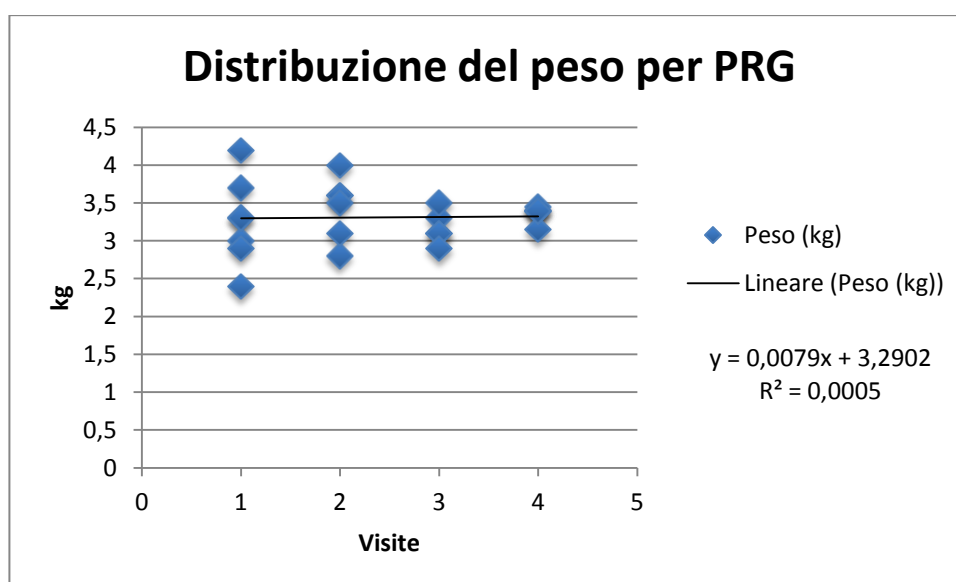


Grafico n°1 - Distribuzione del peso nelle 7 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) durante le quattro visite di monitoraggio effettuate nel corso dello studio. La regressione lineare non mostra alcuna correlazione tra le due variabili considerate ("peso" e "tempo dal trattamento") ($R^2 < 0,4$).

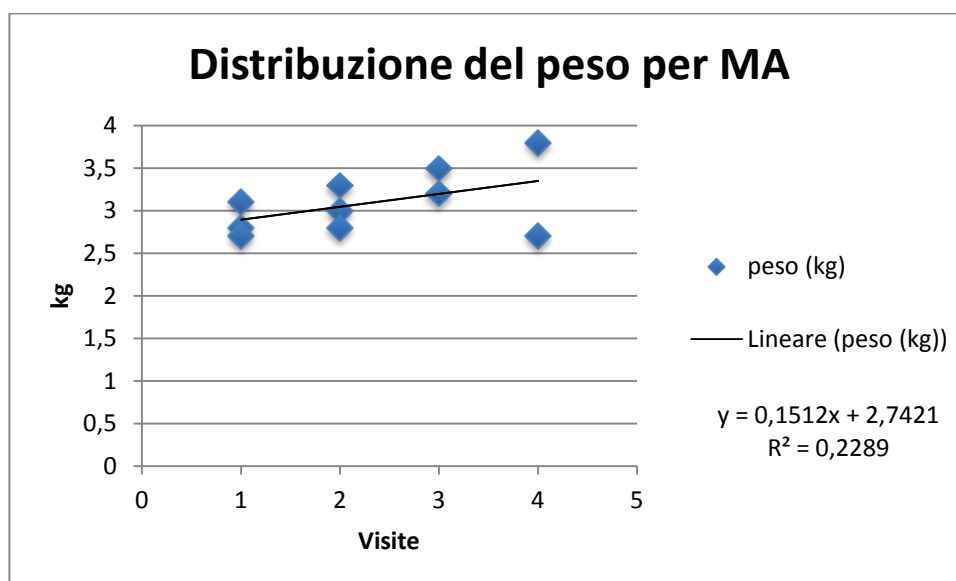


Grafico n°2 - Distribuzione del peso nelle 3 gatte trattate con megestrolo acetato (Estropill®, Merck), durante le quattro visite di monitoraggio effettuate nel corso dello studio. La regressione lineare non mostra alcuna correlazione tra le due variabili considerate ("peso" e "tempo dal trattamento") ($R^2 < 0,4$).

Esame particolare dell'apparato riproduttore

Alla prima visita l'apparato riproduttore di tutti i soggetti rientrava nei limiti della norma, requisito necessario per l'inclusione nello studio. Anche alle visite di controllo successive, nella maggior parte degli animali, non si sono manifestate alcune modificazioni macroscopiche di rilievo clinico, salvo un paio di eccezioni.

La prima eccezione è rappresentata da Bianchina (n°7): la gatta, trattata con proligestone iniettabile, ha sviluppato piometra dopo un mese dalla somministrazione del prodotto. Al momento della diagnosi della patologia (seconda visita), all'esame obiettivo generale l'animale non aveva dato segni di particolare malessere, e alla palpazione dell'addome, lievemente teso e dolorante, l'utero non era risultato distintamente percepibile. Lo scolo vaginale non era abbondante, tanto che ad una prima visita generale era passato inosservato. Solo dopo un'attenta ispezione delle labbra vulvari si è potuta rilevare la presenza di una mediocre quantità di fluido sieroso-purulento di colore giallo-verdastro. La piometra è stata confermata tramite ecografia uterina.

La seconda eccezione è stata invece riscontrata in Gigia, soggetto n°10. La gatta è stata sottoposta a trattamento con megestrolo acetato per circa 10 settimane, e alla seconda e terza visita (rispettivamente dopo 1 e 3 mesi dall'inizio della terapia) non aveva mostrato alcuna modificazione clinicamente rilevabile a livello di apparato riproduttore. Tuttavia, alla quarta visita di controllo eseguita dopo circa 4 mesi dalla prima visita e 10 giorni dopo il primo ritorno in calore post-trattamento, si è notato un leggero aumento del volume e della consistenza del parenchima mammario, percepibile all'ispezione e alla palpazione, in particolar modo a livello dell'ultimo paio di mammelle addominali e della coppia di mammelle inguinali. Non sono stati rilevati dolorabilità, edema o iperemia, né noduli o ulcerazioni; l'infiltrazione adiposa è stata giudicata di discreta entità. In quella stessa data la gatta è stata sterilizzata senza alcuna complicazione. Gigia è stata rivisitata dopo tre mesi dalla sterilizzazione (e quindi a circa 7 mesi dalla prima somministrazione del progestinico), e, dopo aver confermato il perfetto stato di salute dell'animale, si è potuta constatare una diminuzione del parenchima mammario, che è sembrato esser tornato alla normalità; permaneva comunque una modesta infiltrazione adiposa.

Le Figure n°4 riportano due foto scattate la prima alla quarta visita (momento in cui è stato rilevata l'anomalia) e la seconda tre mesi dopo (con il ritorno alla normalità del parenchima mammario). Nella prima foto la tricotomia eseguita in vista della sterilizzazione permette di apprezzare più sensibilmente i limiti delle ghiandole mammarie; nel secondo caso il proprietario non ha acconsentito alla tricotomia, perciò le mammelle nascoste dal pelo risultano poco visibili, anche se questo permette di dedurre la loro regolarità e minore dimensione.



Figura n°4 - Esame dell'apparato riproduttore nel soggetto n°10 (Gigia): nella foto di sinistra (**a.**) (risalente a 4 mesi dopo la prima somministrazione di megestrolo acetato: Estropill®, Merck) è appena distinguibile un leggero aumento del volume del parenchima dell'ultimo paio di mammelle addominali e della coppia di mammelle inguinali; nella foto di destra (**b.**), scattata tre mesi dopo (a circa 7 mesi dal primo giorno di trattamento) è intuibile la riduzione e il ritorno alla normalità delle dimensioni delle ghiandole mammarie.

3.2 ESAMI DEL SANGUE E DOSAGGIO ORMONALE

Gli esami del sangue comprendevano un esame emocromocitometrico e un esame biochimico, e sono stati eseguiti ad ogni visita, con animale a digiuno. Sul soggetto n°7 (Bianchina), la gatta che ha sviluppato la piometra, non è stato purtroppo possibile effettuare gli esami del sangue alla seconda visita a causa della difficoltà di prelievo, probabilmente dovuta all'ipotensione post-intervento chirurgico, anche dettata dai sedativi ed anestetici utilizzati (la medetomidina ad esempio può avere come controindicazione il calo pressorio e la vasocostrizione periferica). Alcuni esami infine risultano mancanti o lacunosi a causa della formazione di coaguli nel campione (ed impossibilità di analisi biochimica) o della quantità insufficiente di sangue che si è riusciti a prelevare.

Per quanto riguarda il profilo biochimico, la maggior parte delle gatte presentava alla prima visita parametri compresi nel range di normalità o di poco discostati da essi. I valori più spesso risultati al di sopra o al di sotto del limite di riferimento in maniera rilevante sono stati:

- La fosfatasi alcalina, mediamente al di sopra del range di normalità in tutti i soggetti tranne che nel n°1, 3 e 9;
- L'albumina, superiore al limite in tutti i soggetti;
- Le proteine totali, mediamente elevate nei soggetti n°3, 4, 7 e 8;
- La glicemia, più bassa del normale nelle gatte n°1, 6, 7, 8 e 9, e più alta nella n°5;
- La creatin-chinasi (CK), di molto superiore al valore limite soprattutto nei soggetti n°2, 5, 6 e 9.

Inoltre, nella gatta n°8 tutti i valori epatici (ALP, ALT, AST, GGT) risultavano alterati e aumentati alla prima visita così come in quelle successive, accompagnati da una persistente ipoglicemia, per cui è stato eseguito anche un esame ecografico dell'addome per escludere eventuali patologie epatiche o extraepatiche: tutti gli organi sono risultati nella norma. Anche nella gatta n°5 ALT e AST sono cresciuti ad ogni visita successiva, ma anche in questo caso l'esame ecografico non ha rivelato alcuna anomalia.

L'analisi statistica ha ad ogni modo identificato una variazione significativa solo per alcuni dei parametri biochimici, ed in particolare l'albumina, le proteine totali, la creatinina ed il colesterolo.

Per quanto riguarda l'albumina, eseguendo un'analisi della varianza (ANOVA) è stata riscontrata una differenza significativa ($P= 0,007$) tra le medie dei valori a seconda della classe di distanza dal trattamento: questa differenza è stata quindi indagata con il test di Tukey e si è riscontrata una divergenza tra la prima e la terza classe di distanza e tra la seconda e la terza solamente nei soggetti trattati con proligestone, ed in particolare si è assistito ad una diminuzione del parametro all'aumentare della distanza dalla prima visita (media alla prima classe: $31,623 \pm 1,060$; media alla seconda classe: $32,792 \pm 1,254$; media alla terza classe: $26,960 \pm 0,991$). Non è invece stata ritrovata alcuna differenza tra le medie dei valori di albumina tra i due gruppi di gatte trattate con i due farmaci.

Le proteine totali sono invece differite tra i due gruppi di sperimentazione ($P= 0,042$), dal momento che le gatte trattate con megestrolo acetato riportavano valori di media inferiori a quelle trattate con proligestone già dalla prima visita ($67,087 \pm 2,940$ vs $72,577 \pm 3,143$).

Nel caso della creatinina c'è stata differenza significativa tra i due gruppi di gatte trattate ($P= 0,002$) e all'interno delle stesse classi di distanza dal trattamento ($P= 0,042$), in quanto nel gruppo di sperimentazione di megestrolo acetato il parametro risultava mediamente più elevato nella prima e terza classe di distanza rispetto al gruppo di trattamento con

proligestone (classe 1: $1,467 \pm 0,102$ vs $1,210 \pm 0,067$; classe 3: $1,725 \pm 0,125$ vs $1,400 \pm 0,059$).

Infine anche per il colesterolo vi è stata una distinzione tra i due gruppi di trattamento ($P=0,022$), dal momento che le gatte sottoposte a terapia con megestrolo acetato ne presentavano mediamente livelli ematici maggiori rispetto alle altre già dalla prima visita ($138,000 \pm 20,003$ vs $115,571 \pm 13,095$).

Nella Tabella n°4 (a, b, c, d) sono riportati tutti i parametri biochimici esaminati ad ogni visita per ciascuna gatta.

a.

PROFILO BIOCHIMICO: VISITA 1											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
Fosforo	5,00	5,66	5,86	6,78*	6,72*	10,00*	7,85*	7,77*	6,17	8,76*	4,3 – 6,6 mg/dl
Magnesio	2,56	2,28	2,35	2,26	2,36	2,74*	2,23	2,33	2,27	2,72*	2,1 – 2,6 mg/dl
Calcio	9,22	9,73	9,91*	9,23	9,68*	9,75*	9,75*	10,00*	9,11	9,67*	8,46 – 9,49 mg/dl
ALP	69	93	34	121*	185*	247*	262*	182*	40	229*	30 - 86 U/l
Bilirubina tot	0,14	0,24	0,51*	0,03*	0,10*	0,18	0,10*	0,15	0,11*	0,15	0,12 – 0,30 mg/dl
AST	22	85	33	28	58*	27	38	64*	30	22	21 - 53 U/l
ALT	52	150	35*	61	217*	53	75	120*	53	49	36,3 – 86,5 U/l
GGT	2,26*	1,10	0,43*	1,88*	1,72	0,47*	2,47*	4,38*	0,00*	2,22*	0,63 – 1,84 U/l
Creatinina	1,14	1,48	1,40	1,40	1,27	0,86*	1,23	1,17	1,35	1,57	1,04 – 1,81 mg/dl
Azotemia	50	58	57	63	47	53	55	45	63	56	44 - 75 mg/dl
Albumina	34,19*	30,09	26,37	31,51*	32,19*	31,38*	32,55*	33,17*	29,96*	29,74*	21,04 – 27,80 g/dl
Proteine tot	67,58	68,17	79,07*	69,06	71,24	63,74	76,29*	81,06*	71,21	61,88	61 – 74 g/dl
Globuline	33	38	53*	38	39	32*	44	48	41	32*	35,2 – 48,1 g/dl
Colesterolo	103	163	185*	100*	94*	93*	129	105	129	122	101 – 173 mg/dl
Trigliceridi	28*	31	94*	34	31*	69	93*	50	36	51	34 – 88 mg/dl
Glicemia	73*	126	166	170	204*	145	74*	89*	92*	177*	106 – 173 mg/dl
CK	137	2022	306	164	1468*	356	222	451	1200*	222	137 – 505 U/l
Rapporto A/G	1,02*	0,79	0,50	0,84*	0,82*	0,97*	0,75*	0,69	0,73*	0,93*	0,47 – 0,71

b.

PROFILO BIOCHIMICO: VISITA 2											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
Fosforo	-	3,55*	5,45	7,95*	6,25	10,05*	-	7,22*	6,19	8,05*	4,3 – 6,6 mg/dl
Magnesio	-	2,25	2,57	2,59	2,75*	2,76*	-	2,72*	2,44	2,21	2,1 – 2,6 mg/dl
Calcio	-	8,53	9,48	10,19*	10,01*	10,51*	-	10,34*	9,92*	9,97*	8,46 – 9,49 mg/dl
ALP	-	97*	50	121*	176*	292*	-	142*	64	146*	30 - 86 U/l
Bilirubina tot	-	0,12	0,07*	0,15	0,12	0,21	-	0,14	0,18	0,18	0,12 – 0,30 mg/dl
AST	-	74*	23	29	46	49	-	39	25	21	21 - 53 U/l
ALT	-	155*	38	68	199*	79	-	131*	54	54	36,3 – 86,5 U/l
GGT	-	2,39*	2,56*	0,37*	1,34	0,00*	-	2,11*	1,92*	0,42*	0,63 – 1,84 U/l
Creatinina	-	1,65	1,66	1,38	1,52	1,26	-	1,34	1,78	1,46	1,04 – 1,81 mg/dl
Azotemia	-	64	64	39*	45	70	-	41*	58	62	44 - 75 mg/dl
Albumina	-	30,94*	28,9*3	33,82*	35,28*	35,43*	-	30,50*	29,34*	30,60*	21,04 – 27,80 g/dl
Proteine tot	-	59,94*	78,83*	78,52*	76,99*	71,38	-	75,31*	72,47	61,11	61 – 74 g/dl
Globuline	-	29*	50*	45	42	36	-	45	43	31*	35,2 – 48,1 g/dl
Colesterolo	-	155	167	104	85*	77*	-	99*	170	115	101 – 173 mg/dl
Trigliceridi	-	23*	46	57	37	62	-	38	35	72	34 – 88 mg/dl
Glicemia	-	129	114	71*	95*	84*	-	90*	72*	128	106 – 173 mg/dl
CK	-	579*	151	138	173	1058*	-	154	207	367	137 – 505 U/l
Rapporto A/G	-	1,07*		0,76*	0,85*	0,99*	-	0,68	0,68	1,00*	0,47 – 0,71

C.

PROFILO BIOCHIMICO: VISITA 3											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
Fosforo	-	-	5,27	6,50	6,33	9,53*	-	6,59	5,80	-	4,3 – 6,6 mg/dl
Magnesio	-	-	2,82*	2,33	2,89*	2,43	-	2,19	2,48	-	2,1 – 2,6 mg/dl
Calcio	-	-	10,21*	9,75*	9,77*	10,20*	-	9,55*	10,66*	-	8,46 – 9,49 mg/dl
ALP	-	-	53	117*	212*	209*	-	122*	80	-	30 – 86 U/l
Bilirubina tot	-	-	0,08*	0,14	0,12	0,13	-	0,11*	0,14	-	0,12 – 0,30 mg/dl
AST	-	-	25	20*	77*	42	-	33	35	-	21 – 53 U/l
ALT	-	-	39	68	318*	109*	-	117*	58	-	36,3 – 86,5 U/l
GGT	-	-	1,13	1,02	0,80	0,00*	-	0,57*	1,17	-	0,63 – 1,84 U/l
Creatinina	-	-	1,69	1,43	1,62	1,32	-	1,40	1,80	-	1,04 – 1,81 mg/dl
Azotemia	-	-	56	37*	48	57	-	40*	52	-	44 – 75 mg/dl
Albumina	-	-	30,56*	27,21	32,35*	28,75*	-	24,66	28,31*	-	21,04 – 27,80 g/dl
Proteine tot	-	-	81,19*	77,42*	69,10	75,29*	-	75,80*	73,57	-	61 – 74 g/dl
Globuline	-	-	51*	50*	37	47	-	51*	45	-	35,2 – 48,1 g/dl
Colesterolo	-	-	150	109	83*	70*	-	80*	194*	-	101 – 173 mg/dl
Trigliceridi	-	-	38	47	26*	51	-	23*	37	-	34 – 88 mg/dl
Glicemia	-	-	105*	135	170	73*	-	76*	84*	-	106 – 173 mg/dl
CK	-	-	273	363	1141*	567*	-	331	153	-	137 – 505 U/l
Rapporto A/G	-	-	0,60	0,54	0,88*	0,62	-	0,48	0,63	-	0,47 – 0,71

d.

PROFILO BIOCHIMICO: VISITA 4											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
Fosforo	6,13	-	-	-	6,42	5,89	-	-	-	5,94	4,3 – 6,6 mg/dl
Magnesio	6,06*	-	-	-	2,42	1,99*	-	-	-	2,08*	2,1 – 2,6 mg/dl
Calcio	8,89	-	-	-	9,23	9,56*	-	-	-	9,08	8,46 – 9,49 mg/dl
ALP	54	-	-	-	134*	225*	-	-	-	109*	30 – 86 U/l
Bilirubina tot	0,15	-	-	-	0,17	0,08*	-	0,28	-	0,04*	0,12 – 0,30 mg/dl
AST	23	-	-	-	53	48	-	36	-	31	21 – 53 U/l
ALT	36*	-	-	-	301*	58	-	-	-	43	36,3 – 86,5 U/l
GGT	0*	-	-	-	1,96*	3,44*	-	0*	-	1,20	0,63 – 1,84 U/l
Creatinina	1,15	-	-	-	1,59	1,28	-	1,12	-	1,65	1,04 – 1,81 mg/dl
Azotemia	49	-	-	-	36*	41*	-	-	-	47	44 – 75 mg/dl
Albumina	25,13	-	-	-	25,97	21,05	-	-	-	23,96	21,04 – 27,80 g/dl
Proteine tot	61,7	-	-	-	64,31	46,78*	-	-	-	52,43*	61 – 74 g/dl
Globuline	37	-	-	-	38	26*	-	-	-	28*	35,2 – 48,1 g/dl
Colesterolo	97*	-	-	-	110	50*	-	-	-	86*	101 – 173 mg/dl
Trigliceridi	27*	-	-	-	152*	22*	-	-	-	29*	34 – 88 mg/dl
Glicemia	67*	-	-	-	319*	85*	-	187*	-	128	106 – 173 mg/dl
CK	119*	-	-	-	534*	253	-	-	-	795*	137 – 505 U/l
Rapporto A/G	0,69	-	-	-	0,68	0,82*	-	-	-	0,84*	0,47 – 0,71

Tabella n°4 - Parametri biochimici misurati nelle 7 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (gatta n°1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e nelle 3 gatte trattate con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (gatta n°2, 9, 10) nel corso della prima visita (a.), della seconda visita a un mese di distanza dalla prima (b.), della terza visita a tre mesi di distanza (c.) e alla quarta visita compresa tra i 4 e i 9 mesi di distanza (d.). I valori segnati con l'asterisco (*) risultano al di fuori del range di normalità.

Per quanto riguarda il profilo ematologico, nessuno dei parametri valutati si è discostato sensibilmente dai range di normalità. In quasi tutte le gatte si è rilevato un MCHC (concentrazione media dell'emoglobina corpuscolare) e HDW (ampiezza della distribuzione emoglobinica) mediamente al di sopra dei valori limite. I soggetti n°5 e n°9 presentavano alla prima visita un leggero stato di anemia, risoltosi alla visita successiva. Le gatte n°1, 7, 8 e 10 presentavano invece trombocitosi e MPV (volume piastrinico medio) aumentato. Più di metà dei soggetti manifestavano inoltre neutropenia e linfocitosi, in alcuni casi (gatta n°5 e 8) persistenti e aggravatisi alle visite di controllo successive. Le gatte n°3, n°8 e n°9, infine, presentavano un lieve aumento degli eosinofili.

Per i parametri ematologici non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa per mezzo del test ANOVA, né tra classi di distanza né tra i due gruppi di trattamento.

I risultati dettagliati delle analisi statistiche eseguite con il test ANOVA per i parametri ematobiochimici sono riportati nella sezione "Allegati" (Allegato n°2).

Nella Tabella n°5 (a, b, c, d) sono riportati tutti i valori dell'esame ematologico esaminati ad ogni visita per ciascuna gatta.

a.

PROFILO EMATOLOGICO: VISITA 1											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
WBC	8,44	10,96	-	14,38	10,16	6,45*	11,57	17,66*	8,43	19,40*	7,56 – 15,25 x10⁹/µl
RBC	7,78	8,50	-	8,00	6,67	7,02	7,79	8,64*	7,31	7,54	6,24 – 8,53 x10⁶/µl
Hgb	10,9	11,3	-	11,5	8,9*	9,9	12,2	13,6*	11,7	10,8	9 – 12,5 g/dl
Hct	30,3	32,2	-	34,6	26,4*	25,7*	39,8	38,5	35,3	33,0	30 – 39,9 %
MCV	38,9*	37,9*	-	43,2	39,6*	36,5*	51,1*	44,6	48,4	43,8	42,5 – 50,8 fl
MCH	14,0	13,2*	-	14,4	13,4*	14,2	15,6	15,7	16,1*	14,4	14 – 15,8 pg
MCHC	36,0*	34,9*	-	33,2*	33,9*	38,8*	30,6	35,2*	33,2*	32,8*	29,5 – 31,9 g/dl
RDW	15,3	15,3	-	15,7	15,7	17,2*	16,1	18,0*	16,0*	14,7*	14,9 – 16,7 %
CHCM	38,8*	36,7*	-	32,8*	34,1*	42,1*	33,6*	40,4*	34,5*	33,2*	28,2 – 31,2 g/dl
CH	15,1	13,9	-	14,2	13,5	15,4	17,2*	17,9*	16,7*	14,6	12 – 16 pg
CHDW	2,49	2,33	-	2,30	2,23	-	2,97*	3,24*	2,66*	2,27	2,17 – 2,53
HDW	3,93*	3,89*	-	2,58*	2,02	3,94*	2,08	4,24*	2,43*	1,93	1,91 – 2,27 g/dl
PLT	480*	281	-	337	85*	401	421*	494*	125*	473*	211 – 407 x10³/µl
MPV	10,3	13,9*	-	19,3*	24,1*	14,7*	14,1*	16,1*	21,5*	11,7*	9,2 – 11,5 fl
PCT	0,49	0,39*	-	0,65	0,21*	0,59	0,59	0,80*	0,27*	0,55	0,4 – 0,65 %
PDW	61,1*	72,3*	-	62,0*	65,6	62,9	63,4	60,5*	67,8	59,1*	62,2 – 69,3 %
% Neutrofili	56,6*	29,0*	-	49,4*	54,3*	29,9*	70,9	56,5*	64,6	38,3*	57,6 – 79,6 %
% Linfociti	37,3	63,0*	-	40,6*	39,2*	57,6*	21,2	32,0	19,0	52,7*	16,3 – 37,4 %
% Monociti	1,9	2,1	-	2,0	1,6*	2,1	2,5	2,6	2,1	3,2	1,8 – 3,3 %
% Eosinofili	4,0	5,5	-	7,6	4,5	9,9	4,7	8,3	14,1	5,2	2 – 10 %
% Basofili	0,1	0,2*	-	0,2*	0,2*	0,2*	0,2*	0,2*	0,0	0,1	0 – 0,1 %
% Luc	0,1	0,2	-	0,1	0,2	0,3	0,6*	0,4	0,2	0,5	0,1 – 0,5 %

b.

PROFILO EMATOLOGICO: VISITA 2											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
WBC	-	10,69	15,08	17,84*	12,36	7,03*	-	17,19*	10,70	16,40*	7,56 – 15,25 x10 ³ /µl
RBC	-	8,52	7,39	9,47	11,13*	8,19	-	7,49	8,05	8,54*	6,24 – 8,53 x10 ⁶ /µl
Hgb	-	11,2	10,4	13,5*	14,5*	11,4	-	11,3	13,2*	12,0	9 – 12,5 g/dl
Hct	-	31,6	36,3	38,8	41,6*	38,0	-	34,0	40,4*	34,6	30 – 39,9 %
MCV	-	37,1*	49,1	41,0*	37,4*	46,3	-	45,4	50,3	40,5*	42,5 – 50,8 fl
MCH	-	13,1*	14,1	14,3	13,1*	13,9*	-	15,1	16,4*	14,0	14 – 15,8 pg
MCHC	-	35,4*	28,8*	34,9*	35,0*	30,0	-	33,3*	32,6*	34,6*	29,5 – 31,9 g/dl
RDW	-	15,1	15,6	16,6	16,2	15,3	-	18,4*	14,4*	14,8*	14,9 – 16,7 %
CHCM	-	35,6*	28,0*	38,6*	37,5*	29,9	-	35,4*	33,7*	37,7*	28,2 – 31,2 g/dl
CH	-	13,2	13,7	15,8	14,0	13,8	-	15,9	17,0*	15,3	12 – 16 pg
CHDW	-	2,08	2,02	2,79*	2,48	2,11*	-	2,49	-	2,77*	2,17 – 2,53
HDW	-	3,34*	1,97	4,33*	4,18*	2,21	-	4,48*	2,20	3,97*	1,91 – 2,27 g/dl
PLT	-	211	383	284	95*	227	-	575*	265	451*	211 – 407 x10 ³ /µl
MPV	-	14,2*	17,0*	20,6*	23,3*	14,5*	-	15,6*	15,5*	11,5	9,2 – 11,5 fl
PCT	-	0,30*	0,65	0,58	0,22*	0,33*	-	0,90*	0,41	0,52	0,4 – 0,65 %
PDW	-	72,0*	53,7*	60,1*	63,4	65,8	-	64,6	72,2*	60,1*	62,2 – 69,3 %
% Neutrofili	-	41,2*	66,8	51,4*	24,3*	37,3*	-	53,6*	64,9	34,4*	57,6 – 79,6 %
% Linfociti	-	49,6*	21,3	39,3*	67,5*	50,8*	-	29,8	21,8	59,5*	16,3 – 37,4 %
% Monociti	-	2,8	2,7	2,5	2,1	2,7	-	2,1	1,8	2,3	1,8 – 3,3 %
% Eosinofili	-	6,0	8,9	6,1	5,7	9,1	-	14,1*	11,1*	3,7	2 – 10 %
% Basofili	-	0,1	0,1	0,3*	0,1	0,1	-	0,1	0,0	0,1	0 – 0,1 %
% Luc	-	0,3	0,2	0,4	0,2	0,1	-	0,2	0,3	0,0	0,1 – 0,5 %

c.

PROFILO EMATOLOGICO: VISITA 3											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
WBC	-	-	12,02	19,07*	11,58	7,82	-	18,92*	-	-	7,56 – 15,25 x10 ³ /µl
RBC	-	-	7,95	8,75	8,00	8,86*	-	7,96	-	-	6,24 – 8,53 x10 ⁶ /µl
Hgb	-	-	11,2	12,1	10,7	12,1	-	11,8	-	-	9 – 12,5 g/dl
Hct	-	-	35,5	38,8	31,1	34,9	-	35,1	-	-	30 – 39,9 %
MCV	-	-	44,6	44,3	38,8*	39,4*	-	44,2	-	-	42,5 – 50,8 fl
MCH	-	-	14,1	13,8*	13,4*	13,7*	-	14,8	-	-	14 – 15,8 pg
MCHC	-	-	31,7	31,1	34,5*	34,7*	-	33,4*	-	-	29,5 – 31,9 g/dl
RDW	-	-	17,7*	14,7*	16,0	15,8	-	14,6*	-	-	14,9 – 16,7 %
CHCM	-	-	33,5*	30,7	37,1*	36,2*	-	34,3*	-	-	28,2 – 31,2 g/dl
CH	-	-	14,8	13,6	14,4	14,2	-	15,2	-	-	12 – 16 pg
CHDW	-	-	2,69*	2,00*	2,76*	2,50	-	2,39*	-	-	2,17 – 2,53
HDW	-	-	5,93*	1,84*	3,73*	4,28*	-	2,99*	-	-	1,91 – 2,27 g/dl
PLT	-	-	420*	334	257	208*	-	553*	-	-	211 – 407 x10 ³ /µl
MPV	-	-	14,7*	21,7*	21,7*	17,9*	-	15,2*	-	-	9,2 – 11,5 fl
PCT	-	-	0,61	0,72*	0,56	0,01*	-	0,84*	-	-	0,4 – 0,65 %
PDW	-	-	61,8*	62,9	62,8	77,4*	-	66,3	-	-	62,2 – 69,3 %
% Neutrofili	-	-	57,8	71,3	31,2*	34,1*	-	52,6*	-	-	57,6 – 79,6 %
% Linfociti	-	-	21,9	20,3	58,1*	53,8*	-	32,7	-	-	16,3 – 37,4 %
% Monociti	-	-	3,2	0,8*	1,5*	3,5*	-	1,9	-	-	1,8 – 3,3 %
% Eosinofili	-	-	16,9*	7,3	8,9	7,8	-	12,7*	-	-	2 – 10 %
% Basofili	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	-	0,1	-	-	0 – 0,1 %
% Luc	-	-	0,1	0,1	0,2	0,6*	-	0,1	-	-	0,1 – 0,5 %

d.

PROFILO EMATOLOGICO: VISITA 4											
GATTA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Valori di riferimento
WBC	14,3	-	-	-	16,66*	6,77*	-	13,58	-	10,35	7,56 – 15,25 x10 ³ /µl
RBC	7,64	-	-	-	6,43	6,31	-	8,00	-	9,25*	6,24 – 8,53 x10 ⁶ /µl
Hgb	11,0	-	-	-	8,5*	8,9*	-	11,30	-	13,6*	9 – 12,5 g/dl
Hct	31,0	-	-	-	25,3*	26,2*	-	37,00	-	39,7	30 – 39,9 %
MCV	41,0	-	-	-	39,3*	41,6*	-	46,20	-	43,0	42,5 – 50,8 fl
MCH	14,5	-	-	-	13,3*	14,0	-	14,20	-	14,7	14 – 15,8 pg
MCHC	35,5	-	-	-	33,8*	33,8*	-	30,60	-	34,2*	29,5 – 31,9 g/dl
RDW	16,4	-	-	-	18,2*	15,3	-	14,30*	-	15,5	14,9 – 16,7 %
CHCM	38,5	-	-	-	35,3*	34,4*	-	31,30*	-	35,7*	28,2 – 31,2 g/dl
CH	16,0	-	-	-	13,7	14,3	-	14,50	-	15,2	12 – 16 pg
CHDW	2,79	-	-	-	2,40	2,31	-	2,02*	-	2,56*	2,17 – 2,53
HDW	4,12	-	-	-	5,57*	3,40*	-	2,08	-	4,80*	1,91 – 2,27 g/dl
PLT	649	-	-	-	251	144*	-	567*	-	422*	211 – 407 x10 ³ /µl
MPV	9,0	-	-	-	23,7*	13,1*	-	15,00*	-	12,6*	9,2 – 11,5 fl
PCT	0,6	-	-	-	0,59	0,19*	-	0,85*	-	0,53	0,4 – 0,65 %
PDW	51,8	-	-	-	59,2*	66,2	-	67,70	-	62,2	62,2 – 69,3 %
% Neutrofili	58,4	-	-	-	53,9*	27,0*	-	43,9*	-	43,4*	57,6 – 79,6 %
% Linfociti	32,7	-	-	-	41,8*	59,1*	-	41,3*	-	51,4*	16,3 – 37,4 %
% Monociti	1,0	-	-	-	0,7*	3,3	-	3,3	-	1,8	1,8 – 3,3 %
% Eosinofili	7,5	-	-	-	3,5	9,4	-	10,7*	-	3,2	2 – 10 %
% Basofili	0,1	-	-	-	0,1	0,2*	-	0,0	-	0,1	0 – 0,1 %
% Luc	0,2	-	-	-	0,0	0,9*	-	0,7*	-	0,0	0,1 – 0,5 %

Tabella n°5 - Parametri ematologici misurati nelle 7 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (gatta n°1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e nelle 3 gatte trattate con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (gatta n°2, 9, 10) nel corso della prima visita (a.), della seconda visita a un mese di distanza dalla prima (b.), della terza visita a tre mesi di distanza (c.) e alla quarta visita compresa tra i 4 e i 9 mesi di distanza (d.). I valori segnati con l'asterisco (*) risultano al di fuori del range di normalità.

Dosaggio ormonale

Il progesterone alla prima visita doveva risultare $\leq 1,0$ ng/ml perché la gatta potesse prender parte al progetto di ricerca; questa concentrazione sierica di P4 è stata rispettata da tutti i soggetti ad eccezione di Bianchina (n°7) il cui valore era di 1,3 ng/ml. Essendo questo valore prossimo al limite prefissato, si è deciso di includere ugualmente la gatta nello studio.

Alle visite successive si è potuto notare in tutti i soggetti una tendenza alla diminuzione della progesteronemia ed una sua permanenza a livelli basali ($< 0,2$ ng/ml). Solamente nella gatta n°3 (Maggie) il progesterone non è mai sceso al di sotto degli 0,2 ng/ml; tuttavia si è sempre mantenuto ai livelli minimi di 0,5-0,6 ng/ml, senza mai superare la concentrazione di 1 ng/ml. La gatta n°5 (Luna), al momento della quarta e ultima visita, era già tornata in calore da circa un mese ed era riuscita ad accoppiarsi; è stata infatti

diagnosticata una gravidanza e confermata dagli alti livelli di progesterone ematico (10,2 ng/ml).

Il test ANOVA non ha rilevato alcuna differenza significativa nella media dei valori di progesterone né tra classi di distanza dal trattamento né tra i due gruppi di sperimentazione. È stato scelto di analizzare la distribuzione delle concentrazioni di progesterone nei due gruppi di trattamento tramite regressione lineare, considerando però solamente al periodo di tempo relativo all'efficacia del farmaco, ed escludendo quindi la quarta visita (momento del ritorno in calore e quindi cessazione dell'effetto contraccettivo). Anche in questo caso si può notare una tendenza alla diminuzione della concentrazione di P4 nel tempo, ma il coefficiente di determinazione non è sufficientemente elevato da confermare una correlazione negativa tra queste due variabili. ($R^2 < 0,40$).

Nella Tabella n°6 sono riportati tutti i valori di progesterone ed estradiolo misurati ad ogni visita per ciascuna gatta. I Grafico n°3 e n°4 mostrano invece la distribuzione delle concentrazioni di progesterone nel corso dello studio nel gruppo di gatte trattate rispettivamente con proligestone e con megestrolo acetato.

GATTA	VISITA 1		VISITA 2		VISITA 3		VISITA 4	
	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	0,35	-	-	-	-	-
3	0,51	-	0,54	39,6	0,60	30,1	-	-
4	< 0,2	-	< 0,2	< 20	< 0,2	72,2	< 0,2	37,2
5	0,46	-	< 0,2	35,2	< 0,2	72,2	10,2	20,1
6	0,21	-	< 0,2	< 20	< 0,2	< 20	< 0,2	< 20
7	1,3	-	-	-	-	-	-	-
8	0,29	-	< 0,2	73,8	< 0,2	61,5	< 0,2	38,8
9	0,41	-	0,2	26,9	0,21	< 20	-	-
10	< 0,2	-	< 0,2	53,9	< 0,2	28,8	< 0,2	< 20

Tabella n°6 - Concentrazioni di progesterone ed estradiolo misurati ad ogni visita di controllo in 10 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (gatta n°1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (gatta n°2, 9, 10). Gli estrogeni sono stati analizzati a partire dalla seconda visita post-trattamento, dopo test di stimolazione con GnRH (Fertagyl, Intervet).

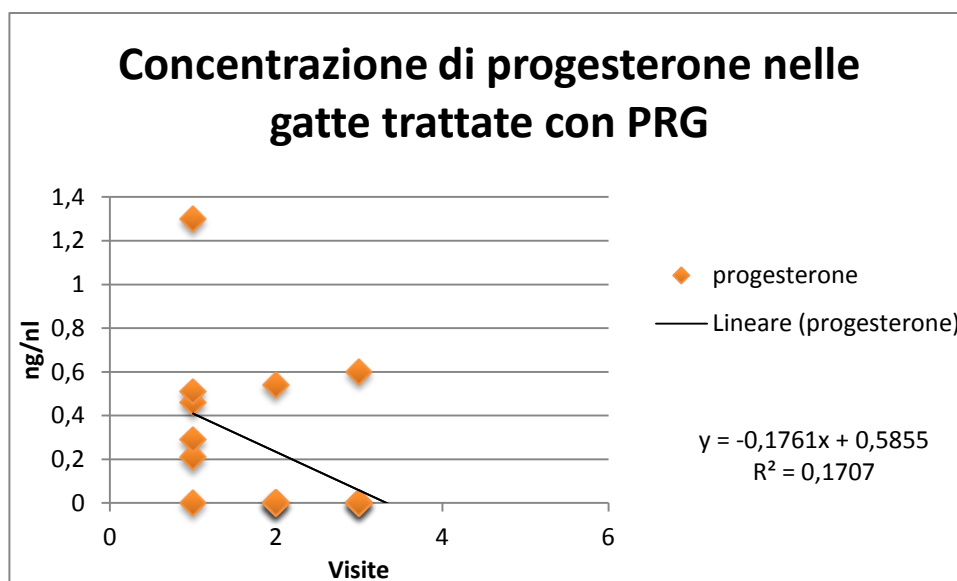


Grafico n°3 - Distribuzione della concentrazione di progesterone misurate nelle 7 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) in un periodo di tempo compreso tra la prima e la terza visita di controllo, corrispondente alla durata approssimativa dell'effetto del farmaco. La regressione lineare non mostra alcuna correlazione tra le due variabili considerate ("concentrazione di progesterone" e "tempo dal trattamento") ($R^2 < 0,4$).

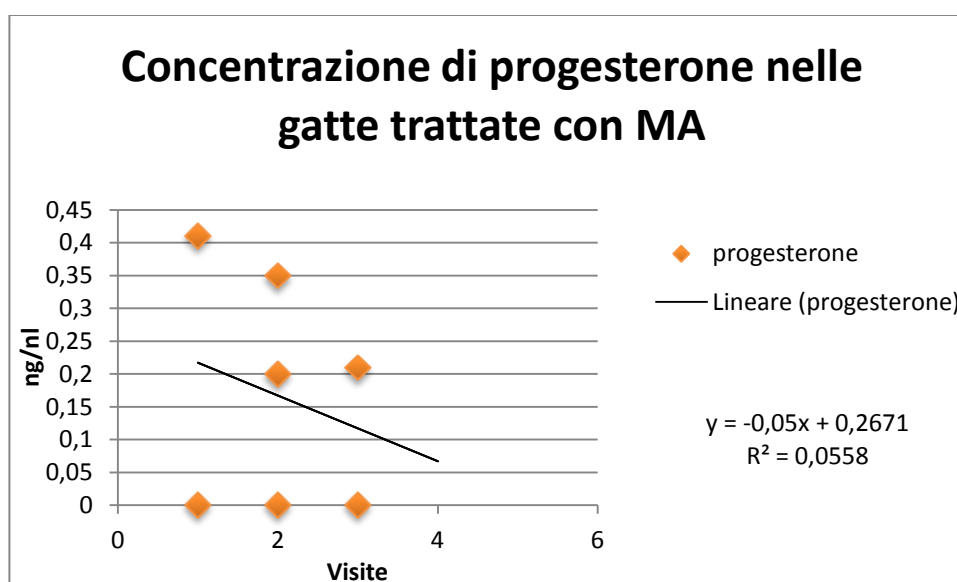


Grafico n°4 - Distribuzione della concentrazione di progesterone misurate nelle 3 gatte trattate con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) in un periodo di tempo compreso tra la prima e la terza visita di controllo, corrispondente alla durata approssimativa dell'effetto del farmaco. La regressione lineare non mostra alcuna correlazione tra le due variabili considerate ("concentrazione di progesterone" e "tempo dal trattamento") ($R^2 < 0,4$).

Il range di concentrazioni di estradiolo ottenute risulta eterogeneo. L'andamento delle misurazioni ematiche di E2 è apparso altalenante, assumendo ad ogni visita valori differenti. Solamente i soggetti n°4, 6, 9 e 10 hanno sfiorato i livelli minimi di E2 (< 20 pg/ml), ed Eclisse (n°6) in particolare si è mantenuta costantemente al di sotto di questo valore durante tutte le visite di controllo. In tutti gli altri soggetti le concentrazioni E2 hanno assunto valori sempre compresi tra i 30 e i 70 pg/ml.

L'analisi statistica eseguita tramite il test ANOVA non ha riscontrato alcuna variazione significativa della concentrazione media di estradiolo ematico tra le diverse classi di distanza (in questo caso sono state considerate solo la seconda e la terza classe, non avendo dosato l'ormone alla prima visita), né tra gruppi di trattamento.

Anche in questo caso si è scelto di analizzare attraverso una regressione lineare la distribuzione delle concentrazioni di estradiolo relative al periodo di piena efficacia del farmaco, escludendo quindi nuovamente la quarta visita. Mentre per le gatte trattate con proligestone non è stata trovata nessuna correlazione tra la concentrazione di E2 e il tempo dal trattamento ($R^2 < 0,40$), per il gruppo di sperimentazione con megestrolo acetato è stata invece dimostrata una significativa correlazione negativa tra le due variabili ($R^2 = 0,464$), ovvero all'aumentare del tempo dal primo giorno di trattamento è diminuita progressivamente la concentrazione di estradiolo ematico.

Nei Grafici n°5 e n°6 sono riportate le distribuzioni delle concentrazioni di estradiolo nel corso dello studio nel gruppo di gatte trattate rispettivamente con proligestone e con megestrolo acetato.

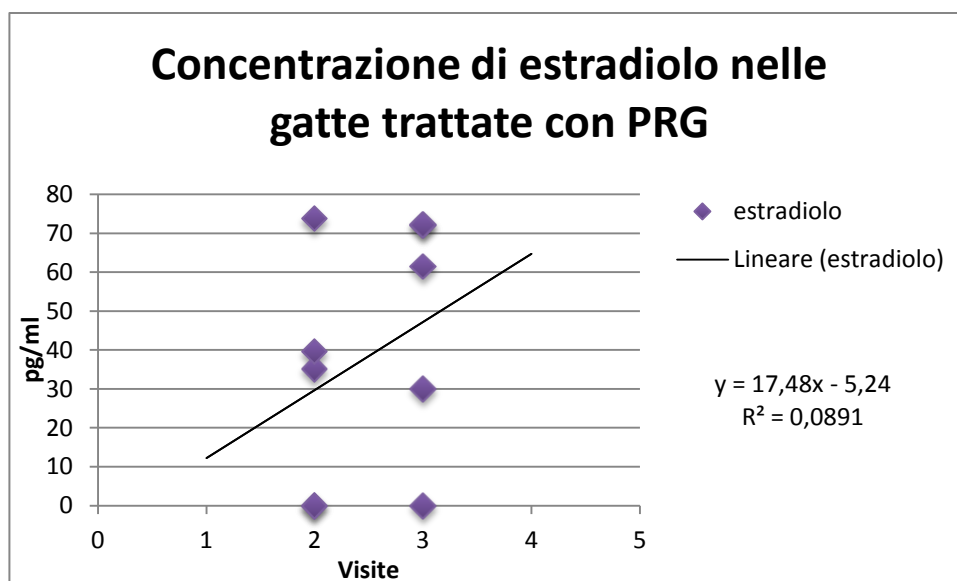


Grafico n°5 - Distribuzione della concentrazione di estradiolo misurate nelle 7 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) in un periodo di tempo compreso tra la prima e la terza visita di controllo, corrispondente alla durata approssimativa dell'effetto del farmaco. La regressione lineare non mostra alcuna correlazione tra le due variabili considerate ("concentrazione di estradiolo" e "tempo dal trattamento") ($R^2 < 0,4$).

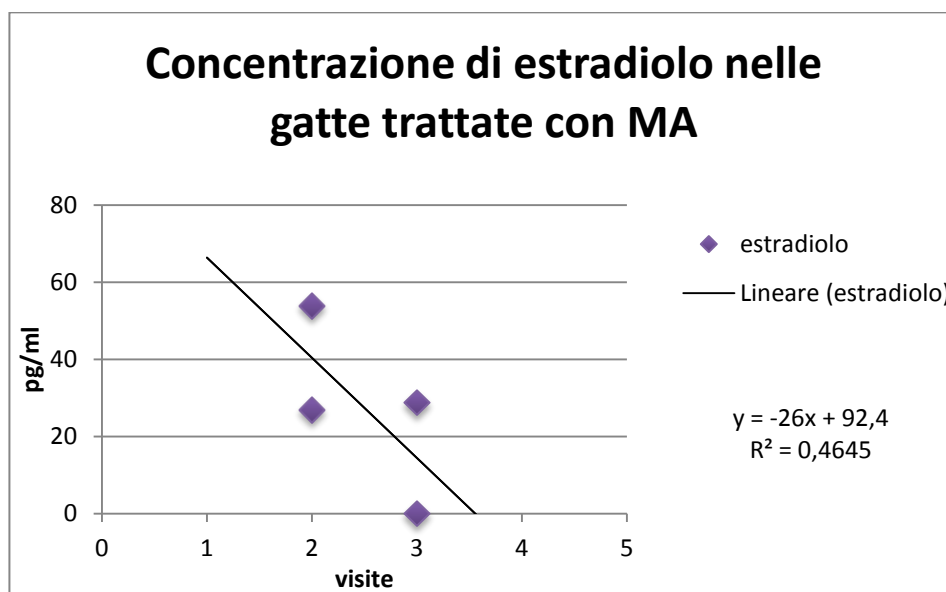


Grafico n°6 - Distribuzione della concentrazione di estradiolo misurate nelle 3 gatte trattate con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) in un periodo di tempo compreso tra la prima e la terza visita di controllo, corrispondente alla durata approssimativa dell'effetto del farmaco. La regressione lineare mostra una certa correlazione positiva tra le due variabili considerate ("concentrazione di estradiolo" e "tempo dal trattamento") ($R^2 = 0,464$).

3.3 CITOLOGIA VAGINALE

I risultati ottenuti si sono rivelati moderatamente eterogenei. In alcuni dei soggetti si è assistito ad un aumento progressivo delle cellule non cheratinizzate a dispetto di quelle cheratinizzate; è questo il caso delle gatte n°8 (Europa), n°9 (Tequila) e n°10 (Gigia), in cui le cellule parabasali da percentuali dello 0-15% misurate alla prima visita, hanno raggiunto valori del 70-90% (nel caso di Tequila già ad un mese dall'inizio del trattamento), mentre le cheratinizzate sono gradualmente scese dal 50-90% a meno del 30% delle cellule totali. La gatta n°4 (Micia) e n°5 (Luna) presentavano già alla prima visita una netta dominanza di cellule non cheratinizzate, ed hanno mantenuto queste caratteristiche citologiche pressoché costanti per tutta la durata dello studio. In Micia è stata rilevata una notevole percentuale di neutrofili non degenerati (78%) alla terza visita di controllo, non più riscontrata alla visita successiva. Il soggetto n°7 (Bianchina) presentava già una modesta percentuale di granulociti neutrofili alla prima visita (34%), e alla visita successiva, ad un mese di distanza, il loro numero era quasi triplicato. Nel preparato citologico erano inoltre visibili grandi quantità di batteri (cocchi e bacilli).

Un'eccezione all'andamento generale della citologia vaginale è rappresentata dalla gatta n°3 (Maggie) e n°6 (Eclisse). Maggie ha visto una diminuzione delle cellule parabasali, accompagnate però da un notevole aumento delle intermedie, e allo stesso tempo da una modesta e costante crescita delle cheratinizzate. Eclisse, invece, mostrava inizialmente un 97% di cellule non cheratinizzate (parabasali e intermedie), mentre alla seconda visita le cellule cheratinizzate erano salite ad oltre l'80% a discapito delle altre categorie cellulari, condizione che si è ripresentata molto simile anche alla terza visita a tre mesi dall'iniezione del progestinico. Alla quarta e ultima visita, effettuata a circa 5 mesi da inizio trattamento e dopo dieci giorni dal ritorno in calore, si è ritornati invece ad una predominanza di cellule non cheratinizzate (circa 70% tra parabasali e intermedie).

Alle gatte n°1 e n°2 non è stato effettuato alcuno striscio vaginale, per cui mancano i dati relativi all'andamento della cellularità vaginale.

L'analisi statistica, eseguita per mezzo del test ANOVA, ha dimostrato una differenza significativa nella variazione della percentuale media delle cellule cheratinizzate a seconda della classe di distanza ($P=0,017$) e del tipo di trattamento ($P<0,001$). Vi è stata infatti una diminuzione sensibile della percentuale di cheratinizzazione nella seconda e terza classe rispetto alla prima, significativa però solo nelle gatte trattate con megestrolo acetato (classe 1: $90,000 \pm 15,529$; classe 2: $0,000 \pm 15,529$; classe 3: $16,000 \pm 12,679$).

All'interno della classe 1 inoltre è stata stimata una differenza di percentuale media di cellule cheratinizzate tra i due gruppi di trattamento (megestrolo acetato vs proligestone) dell'84%, con $P < 0,001$.

Non è stata invece rilevata alcuna differenza significativa nelle percentuali medie di cellule parabasali e intermedie, né tra classi di distanza né tra gruppi di trattamento. Cumulando queste ultime due tipologie cellulari (che di fatto vengono spesso valutate come una categoria unica quando si esaminano gli strisci vaginali), si è confrontato l'andamento medio della categoria "cellule non cheratinizzate" ed apprezzato la tendenza all'aumento durante il corso dello studio ($> 70\%$), che è andata di pari passo con la diminuzione delle cellule cheratinizzate ($< 30\%$) (Grafico n°7).

Nella Tabella n°7 sono riportate tutte le percentuali calcolate per le diverse tipologie cellulari di ogni striscio vaginale eseguito durante ciascuna visita di controllo in ciascuna gatta. Le Figure n°5, 6, 7, 8 e 9 rappresentano alcuni degli esempi di aspetto al microscopio ottico di strisci vaginali di gatta in varie fasi del ciclo riproduttivo, tratti dalla documentazione fotografica prodotta durante l'arco della sperimentazione.

I risultati dettagliati delle analisi statistiche eseguite con il test ANOVA per lo studio della variazione della percentuale media di cheratinizzazione sono riportati nella sezione "Allegati" (Allegato n°2).

GATTA	Visita	% Cellule parabasali	% Cellule intermedie	% Cellule cheratinizzate	% Neutrofili
3 (Maggie)	1	66	34	0	0
	2	14	73	13	0
	3	20	50	30	0
4 (Micia)	1	95	5	0	0
	2	20	64	16	0
	3	1	21	0	78
	4	65	4	31	0
5 (Luna)	1	65	35	0	0
	2	70	29	1	0
	3	76	24	0	0
	4	90	7	3	0
6 (Eclisse)	1	41	56	3	0
	2	0	12	88	0
	3	0	29	71	0
	4	30	45	25	0
7 (Bianchina)	1	0	38	28	34
	2	1	18	0	81
8 (Europa)	1	13	82	5	0
	2	9	80	11	0
	3	16	63	21	0
	4	88	5	7	0
9 (Tequila)	1	0	17	83	0
	2	90	10	0	0
	3	89	6	5	0
10 (Gigia)	1	0	3	97	0
	2	38	62	0	0
	3	42	41	14	3
	4	60	11	29	0

Tabella n°7 - Percentuali delle diverse tipologie di cellule epiteliali (cellule parabasali, intermedie, cheratinizzate) e cellule del sangue (neutrofili), riscontrate durante la valutazione degli strisci vaginali eseguiti in 10 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (gatta n°1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (gatta n°2, 9, 10).

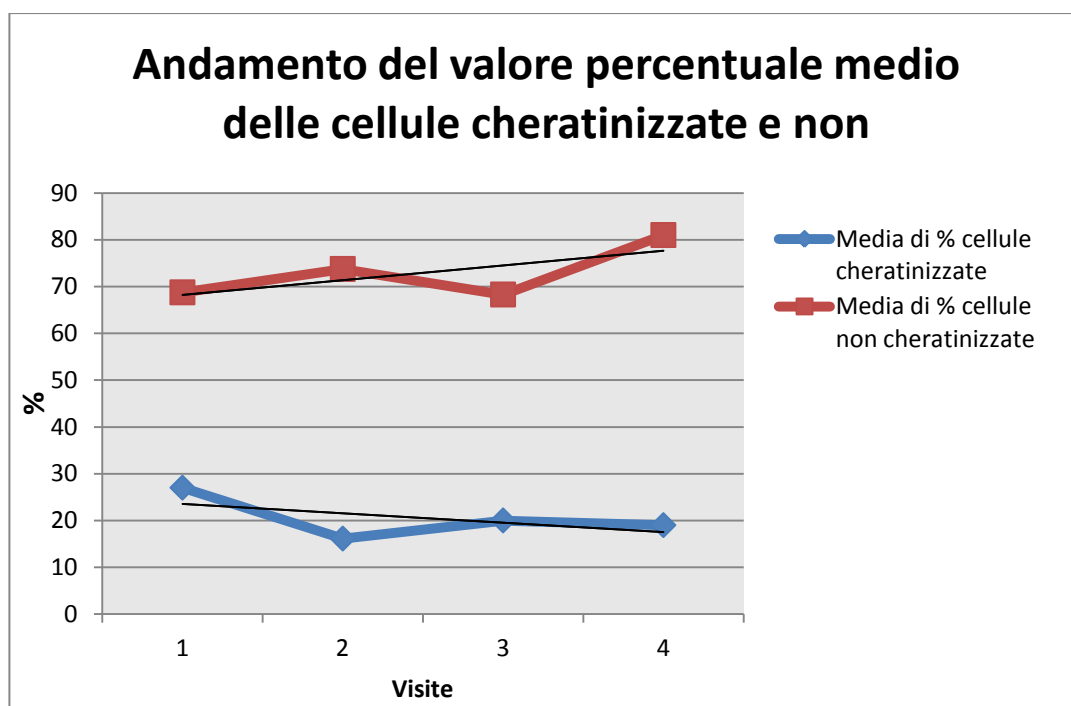


Grafico n°7 - Andamento delle percentuali medie delle cellule cheratinizzate e non (parabasali e intermedie) calcolate dall'analisi dei preparati colpocitologici eseguiti in occasione di ogni visita di controllo in

10 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (N= 7) e con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (N= 3).

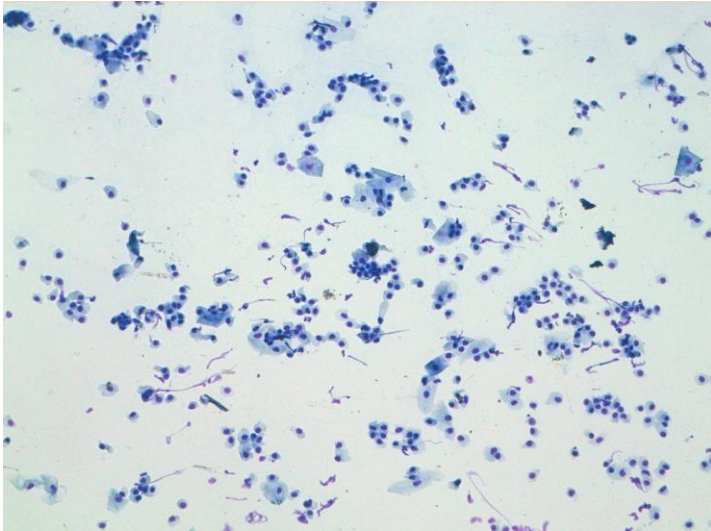


Figura n°5 - Colpocitologia eseguita nel soggetto n°9 ad un mese dall'inizio del trattamento con megestrolo acetato (Estropill®, Merck). La cellularità è moderata e prevalgono le cellule parabasali ed intermedie (**b.**), indicative di uno stato di quiescenza riproduttiva. (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 10x)

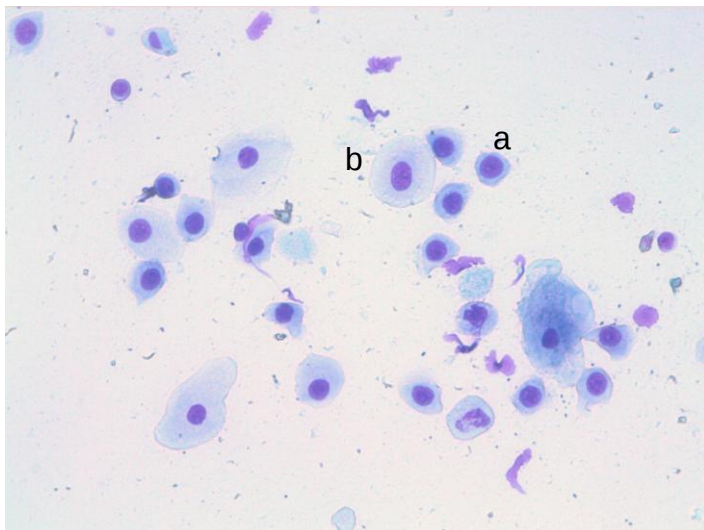


Figura n°6 - Particolare del preparato citologico eseguito nel soggetto n°5 a tre mesi dalla somministrazione di proligestone (Covinan®, Merck). Lo stato di anestro è esemplificato dalla prevalenza di cellule parabasali (**a.**) ed intermedie (**b.**). (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 40x)

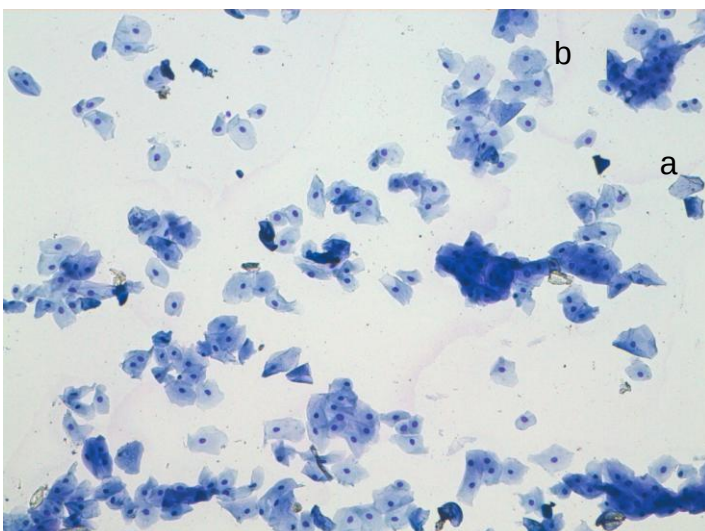


Figura n°7 - Colpocitologia del soggetto n°6 eseguita a un mese dalla somministrazione di proligestone (Covinan®, Merck). La tipologia cellulare prevalente è caratterizzata da cellule ancora provviste di nucleo ma in via di cheratinizzazione (**a.**), e da cellule con nucleo picnotico già completamente cheratinizzate (**b.**). (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 10x)

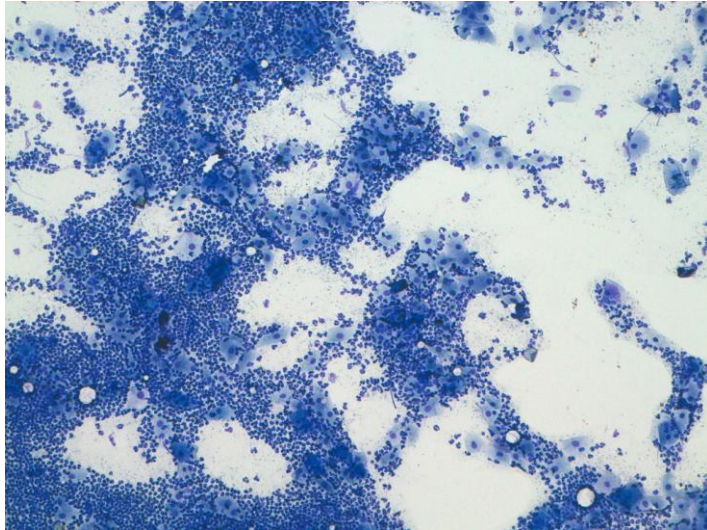


Figura n°8 - Colpocitologia eseguita nel soggetto n°7 ad un mese dalla somministrazione di proligestone (Covinan®, Merck). Alla visita la gatta presentava scolo vulvare purulento, confermato dall'abbondante presenza di granulociti neutrofili prevalentemente non degenerati, frammisti a cellule intermedie e parabasali. (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento 10x)

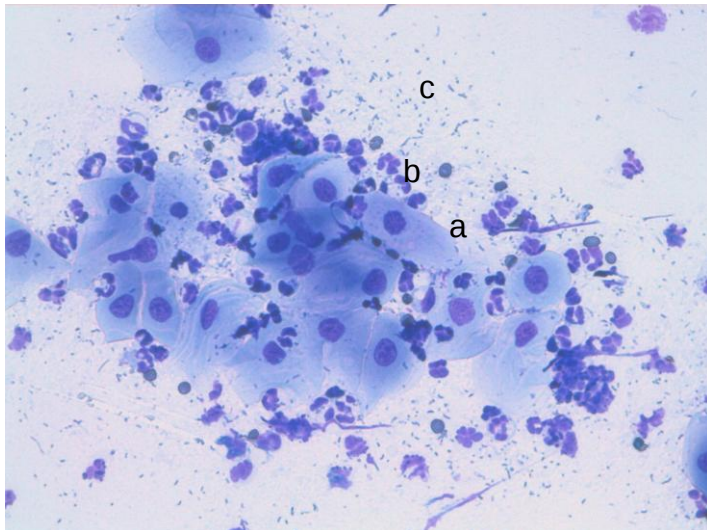


Figura n°9 - Particolare dello striscio vaginale della gatta n°7, trattata con proligestone (Covinan®, Merck). Le cellule intermedie (a.) sono circondate da un abbondante numero di neutrofili per la maggior parte non degenerati (b.) e da batteri (cocchi e bacilli) (c.) (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 40x)

3.4 ECOGRAFIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE

Nella maggior parte delle gatte l'ovaio è risultato scarsamente evidenziabile, specialmente nei soggetti di dimensioni ridotte o con abbondante deposito adiposo circondante le gonadi, per cui solamente l'utero è stato oggetto di esame.

Il diametro fisiologico dell'utero felino, stimato durante la prima visita, era risultato compreso tra 0,3-0,8 cm, misurato in più sezioni trasversali dell'organo. In quasi tutte le gatte queste dimensioni si sono mantenute costanti durante tutto l'arco dello studio, o hanno mostrato una leggera tendenza all'aumento, pur sempre rimanendo all'interno dei range fisiologici e non superando mai i diametri massimi rilevati alla prima visita. Le variazioni medie del diametro uterino, analizzati con il test ANOVA, non sono infatti risultate statisticamente significative, né tra gruppi di trattamento né tra classi di distanza.

L'eccezione è rappresentata ancora una volta dal soggetto n°7 (Bianchina). Alla prima visita il diametro uterino minimo rilevato era di 0,5 cm, mentre quello massimo arrivava a 0,79 cm. Alla seconda visita, invece, non è stato difficile identificare le corna uterine, in quanto visibilmente dilatate e ripiene di contenuto liquido anecogeno o in certi punti moderatamente ecogeno. Lo spessore delle pareti dell'organo sembrava rientrare nei limiti della norma, mentre il diametro totale del corno appariva sensibilmente aumentato: a seconda del sito di misurazione esso variava da 0,97 cm a 1,69 cm.

Infine il soggetto n°5 (Luna) all'ultima visita è stata diagnosticata gravida di circa un mese, per la presenza di quattro feti ben visibili e vitali, per cui non è stato possibile prendere alcuna misurazione finale del diametro uterino.

I Grafici n°8 e 9 riportano rispettivamente i valori minimi e massimi del diametro uterino misurati in ciascuna gatta durante ogni visita di controllo. La Figure n° 10 mostra alcune delle immagini ecografiche ottenute durante i monitoraggi eseguiti alle varie visite di controllo.

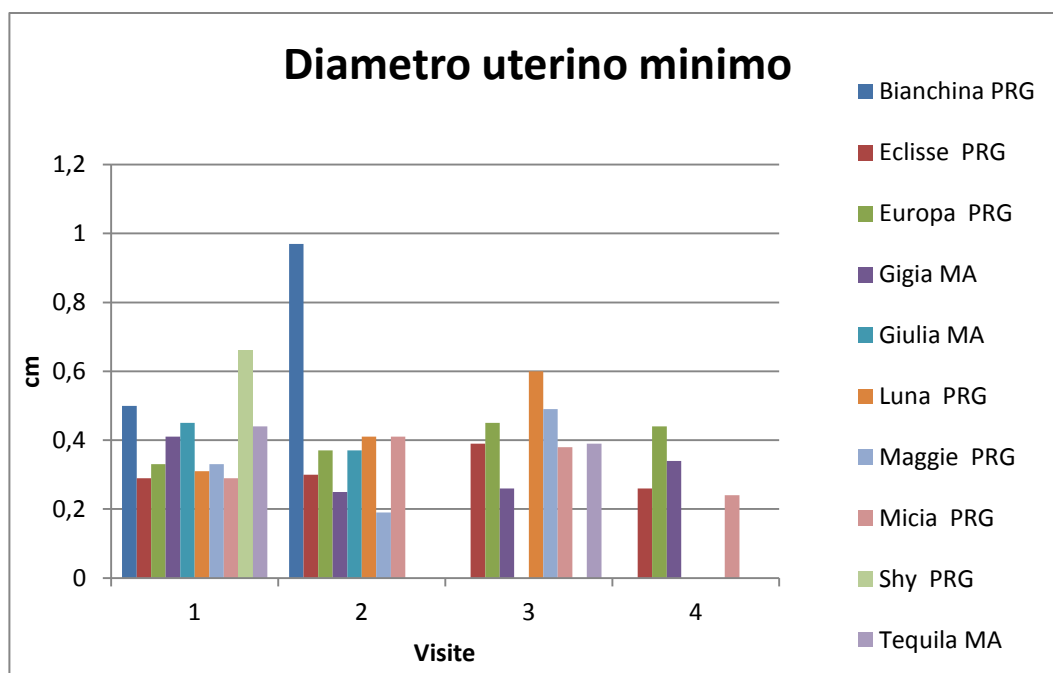


Grafico n°8 - Rappresentazione dei diametri uterini minimi misurati durante ogni visita di controllo in 10 gatte trattate con proligestone (PRG) (Covinan®, Merck) e con megestrolo acetato (MA) (Estropill®, Merck). Il valore massimo rilevato appartiene al soggetto n°7 (Bianchina) che ha sviluppato piometra dopo un mese dal trattamento con proligestone (diagnosticata alla seconda visita di controllo).

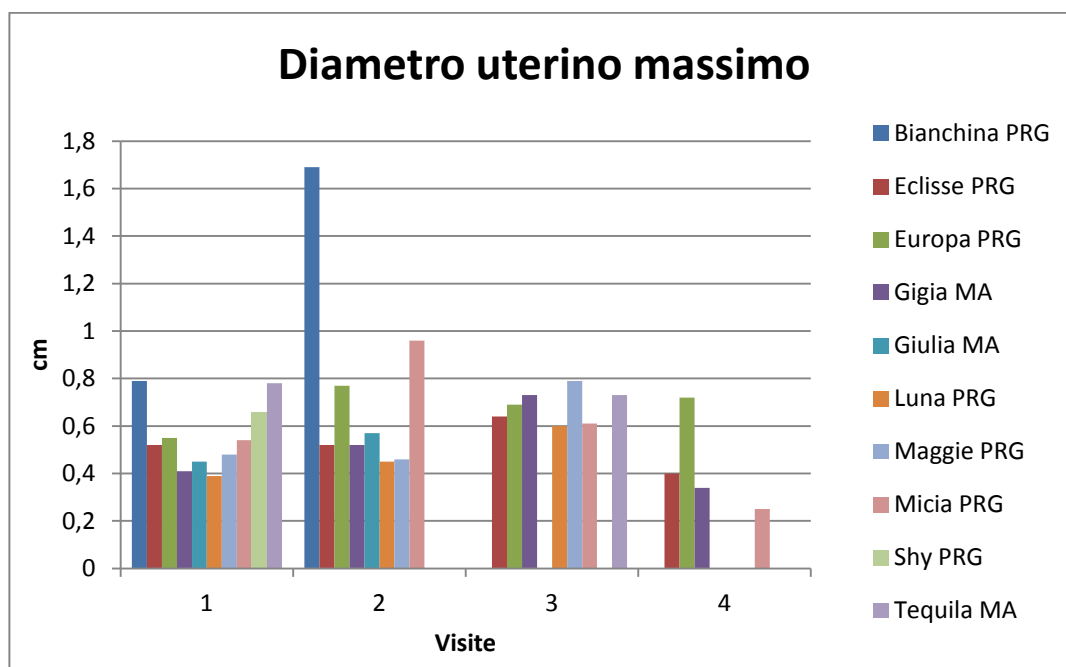


Grafico n°9 - Rappresentazione dei diametri uterini massimi misurati durante ogni visita di controllo in 10 gatte trattate con proligestone (PRG) (Covinan®, Merck) e con megestrolo acetato (MA) (Estropill®, Merck). Il valore massimo rilevato appartiene al soggetto n°7 (Bianchina) che ha sviluppato piometra dopo un mese dal trattamento con proligestone (diagnosticata alla seconda visita di controllo).

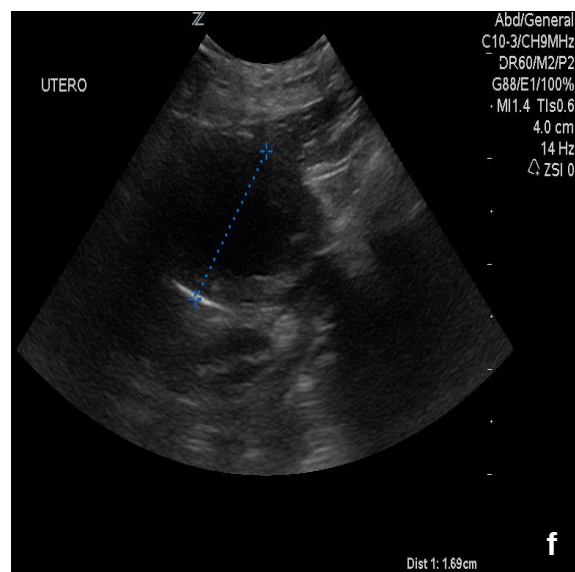
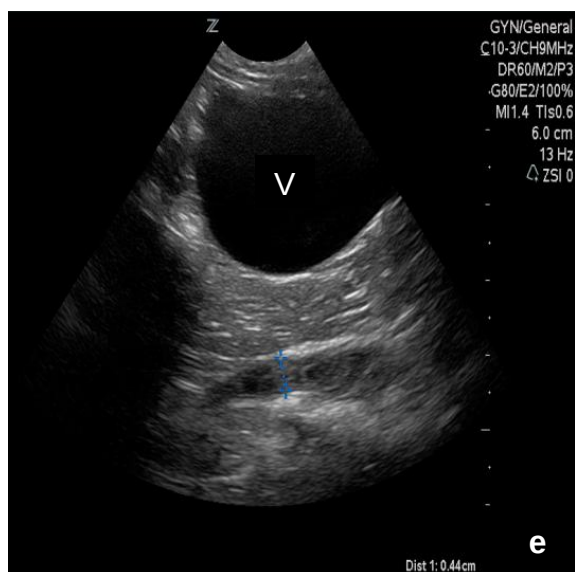
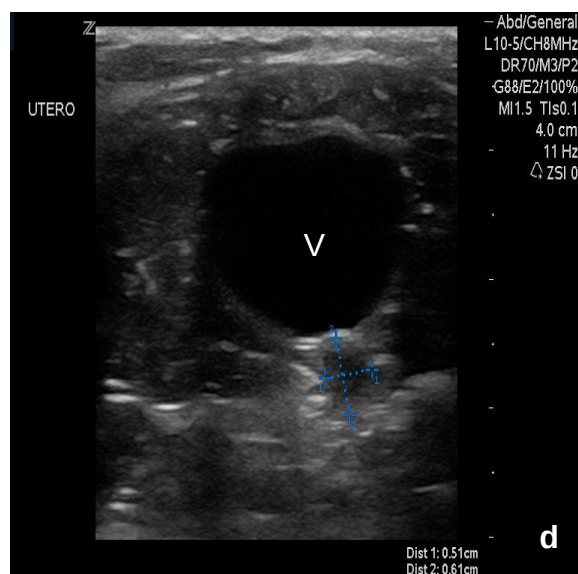
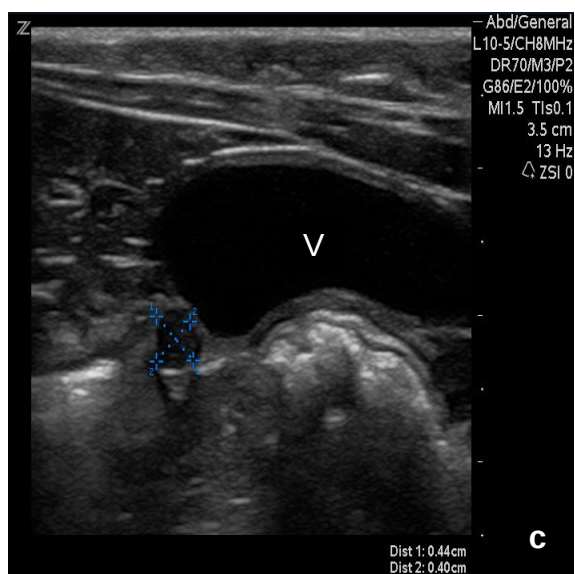
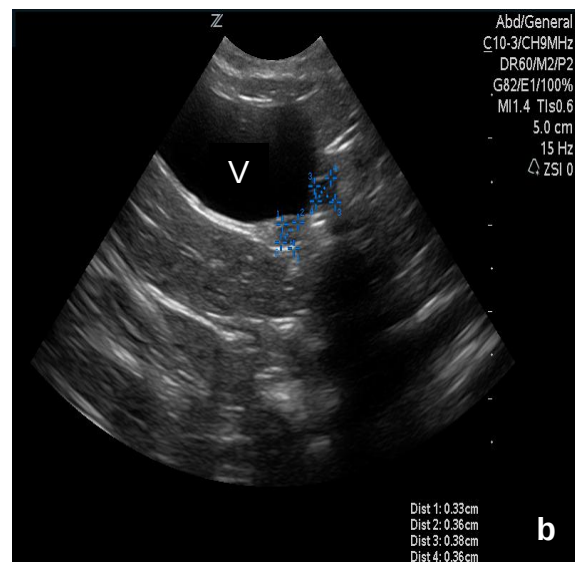
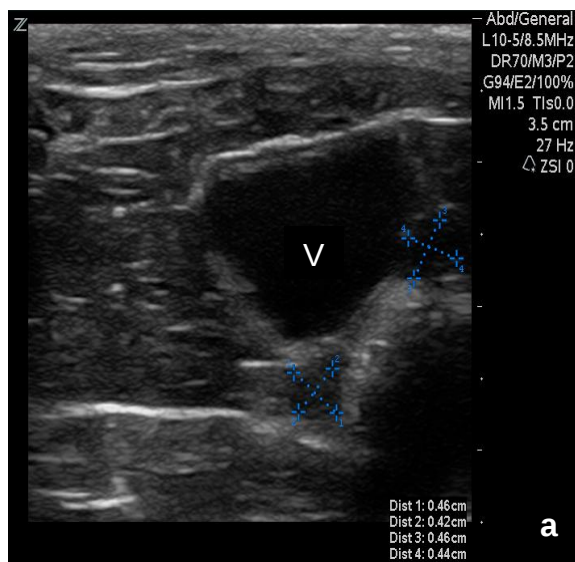


Figura n°10 - Immagini ecografiche dell'utero del soggetto n°3 trattato con PRG (Covinan®, Merck) effettuate alla prima visita (a.) e alla seconda (c.) a un mese di distanza, e del soggetto n°10 trattato con MA (Estropill®, Merck) anch'esse eseguite alla prima (b.) e seconda visita (d.). Le figure a. e b. mostrano le misurazioni dei diametri di entrambe le corna uterine in sezione trasversa, adiacenti alla vescica (V.); le figure c. e d. sono misurazioni prese da un solo corno. Le immagini e. e f. rappresentano sezioni longitudinali dell'utero del soggetto n°7, trattato con proligestone (Covinan®, Merck), la prima effettuata alla prima visita, la seconda ad un mese di distanza; il lume notevolmente dilatato ed il contenuto liquido anecogeno hanno permesso di emettere diagnosi di piometra.

3.5 QUESTIONARI ETOLOGICI

Sui risultati complessivi derivanti dalla compilazione dei moduli etologici è stata effettuata solo un'analisi di tipo descrittivo e non statistico. Alcuni parametri hanno mantenuto un andamento pressoché costante durante tutto lo studio, come nel caso degli atteggiamenti esplorativi, di gioco o caccia, così come le abitudini e le frequenze eliminatorie; altri (soprattutto quelli relativi alla sfera sessuale, all'indole e al livello di attività dell'animale) hanno subito invece delle modificazioni nel corso della ricerca. In particolare:

- L'indole dell'animale è rimasta approssimativamente identica in tutte le gatte, alcune più attive e giocherellone, altre più tranquille e casalinghe. Fanno eccezione Maggie (n°3), che ha mostrato una crescente sedentarietà nel tempo, e Micia (n°4), che invece è diventata più attiva;
- L'alimentazione si è mantenuta identica, principalmente commerciale o casalinga, anche se alcune gatte hanno iniziato a mostrare preferenza per entrambe le tipologie di cibo (n°3 e n°9). Maggie (n°3) si è dimostrata sempre meno vorace nell'assunzione dell'alimento, mentre Tequila (n°9) ha aumentato l'appetito;
- Le abitudini eliminatorie, così come la loro frequenza e tipologia (normalità di feci e urine) è rimasta invariata, anche se spesso questi dati risultavano incompleti per l'impossibilità del proprietario di monitorare l'animale quando questo espletava le sue funzioni organiche all'esterno anziché nella cassettona igienica;
- La frequenza delle vocalizzazioni ha subito delle modifiche: in quasi tutte le gatte infatti queste sono diminuite se non scomparse del tutto, già a partire dalla seconda visita di controllo. Solamente in Tequila (n°9) si sono mantenute costanti anche se, a parere della proprietaria, è cambiata la finalità di tale comportamento: mentre prima si trattava principalmente di richiami sessuali, in seguito le vocalizzazioni si sono rivelate principalmente rivolte alla richiesta di cibo ed attenzioni;
- Le graffiature (emesse principalmente su substrati quali tronchi, tappeti, mobili e tiragraffi) sono diminuite sensibilmente soprattutto in Maggie (n°3), Micia (n°4), Eclisse (n°6) e Europa (n°8), per poi riacquistare la frequenza originaria in corrispondenza del termine dello studio con il ritorno in calore. Le marcature facciali sono invece rimaste costanti in tutti quei soggetti che le avevano di consuetudine sempre manifestate;
- Il rilevamento dei calori ha mostrato una notevole diminuzione in tutti i soggetti: già dalla seconda visita, ad esempio in Eclisse (n°6), si è passati da una frequenza di

manifestazioni estrali di “una o più volte al giorno” a “nessuna”, per poi tornare a “una o più volte alla settimana” alla quarta visita, dopo il ritorno in calore post-trattamento. Anche Tequila (n°9) ha seguito lo stesso andamento, rimanendo tuttora quiescente. Anche nelle gatte che manifestavano i segni estrali con una minore frequenza, vale a dire mensilmente (gatta n°2, 3, 4 e 8), questi comportamenti sono scomparsi definitivamente per tutta la durata dell'effetto del farmaco. Gigia (n°10) non aveva ancora manifestato segni evidenti di calore alla prima visita (pur essendo probabilmente già in estro, secondo i risultati della colpocitologia); al termine dell'effetto del progestinico è passata invece ad una frequenza giornaliera di marcati atteggiamenti riproduttivi. Non abbiamo dati circa il comportamento sessuale di Shy (n°1). Le manifestazioni estrali più spesso e facilmente rilevate dai proprietari sono state vocalizzazioni insistenti, strofinamenti e rotolamenti. La durata media del calore per quasi tutte le gatte era di circa 6-7 giorni, ed i periodi dell'anno in cui questi comportamenti si facevano più evidenti erano compresi tra gennaio e settembre; solo Tequila (n°9) manifestava segni estrali anche a fine dicembre, e Giulia (n°2) sembrava andare in calore durante tutti i periodi dell'anno.

- Le ore di sonno sono lievemente aumentate in Eclisse (n°6), e quasi dimezzate invece in Micia (n°4) e Tequila (n°9); sono invece rimaste costanti nelle altre gatte. Solo i soggetti n°2, 3, 7 e 10 sono sempre rimasti attivi anche di notte; Eclisse (n°6) lo è diventata al termine del trattamento. Tutte le gatte hanno inoltre avuto libero accesso all'esterno ad eccezione di Giulia (n°2) e Gigia (n°10). Eclisse (n°6), Luna (n°5) e Tequila (n°9) sono rimaste sempre nel giardino di casa o comunque nei dintorni, mentre Europa (n°8), Maggie (n°3), Micia (n°4) e Shy (n°1) spesso si allontanavano molto. Il grado di vagabondaggio è comunque rimasto costante in tutti i soggetti, forse leggermente diminuito in Tequila (n°9). La difesa del territorio non è mai stata molto sentita se non in Maggie (n°3), Shy (n°1) e Tequila (n°9); quest'ultima sembra aver accentuato nel tempo la propria territorialità;
- La frequenza di caccia (lucertole, topi, insetti e uccellini le prede preferite) e di gioco (con oggetti, altri animali o con il proprietario) è rimasta invariata nelle gatte che usualmente praticavano tali attività;
- La tendenza all'aggressione è diminuita in Tequila (n°9), che prima dell'inizio dello studio era solita manifestare ostilità soprattutto nei confronti di gatti conosciuti o sconosciuti nel proprio territorio, prevalentemente femmine; è aumentata invece in

Micia (n°4), che si è rivelata spesso aggressiva sia verso persone che verso i gatti ritrovati all'interno del proprio ambiente. Maggie (n°3) ha mantenuto costante la sua avversità per gli animali (gatti e non) all'interno del suo territorio;

- Tutte le gatte tranne Micia (n°4) possedevano il controllo del morso e degli artigli, e la tolleranza alle manipolazioni è rimasta identica nel corso dello studio (alcune le adorano, altre vi erano indifferenti); solo Micia ha mostrato spesso segni di aggressività se manipolata a lungo.

Nella Tabella n°8 è riportata la variazione dei principali parametri etologici nelle gatte partecipanti allo studio nel corso della sperimentazione.

PARAMETRI	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Attività	NV	NV	-	+	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Assunzione alimento	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV	NV	+	NV
Eliminazione	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Vocalizzazioni	-	-	-	-	-	-	-	-	NV	-
Graffiature	NV	NV	-	-	NV	-	NV	-	NV	NV
Marcature facciali	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Calori	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ore di sonno	NV	NV	NV	-	NV	+	NV	NV	-	NV
Vagabondaggio	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	-	NV
Caccia	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Gioco	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Aggressività	NV	NV	NV	+	NV	NV	NV	NV	-	NV
Manipolazioni	NV	NV	NV	-	NV	NV	NV	NV	NV	NV

Tabella n°8 - Variazioni dei principali parametri etologici valutati in 10 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) (soggetto n°1, 3, 4, 5, 6, 7, 8) e con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) (soggetto n°2, 9, 10) nel corso dello studio. Il segno "+" indica un aumento della frequenza e/o intensità del comportamento, "-" una diminuzione e "NV" nessuna variazione.

3.6 INTERVALLO TRATTAMENTO-RITORNO IN CALORE

Per quanto riguarda le gatte trattate con proligestone, la durata media dell'anestro indotto da un'unica somministrazione del farmaco è stata di 193 giorni. I picchi di efficacia maggiori si sono riscontrati nel soggetto n°1 (240 giorni), n°4 (244 giorni) e n°8 (209 giorni), mentre per le gatte n°6 (Eclisse, durata effetto: 148 giorni) e n°5 (Luna, 122 giorni) non si sono mai superati i 200 giorni. Per Maggie (n°5) non è stato purtroppo possibile stimare questo intervallo a causa della sua prematura scomparsa. Alla luce di un incremento della sua sedentarietà durante l'arco dello studio, si potrebbe ipotizzare che l'aumento del vagabondaggio possa essere in qualche modo legato ad una ripresa dell'attività ciclica ed ad un crescente interesse per il contatto con l'ambiente esterno ed i conspecifici; se così fosse, dal momento del primo trattamento al momento della scomparsa sarebbero intercorsi all'incirca 190 giorni. Tuttavia questo dato non può essere preso in considerazione nella ricerca poiché mancano le basi scientifiche per dimostrarlo. Anche per Bianchina (n°7) non è stato possibile calcolare la durata effettiva del trattamento poiché ha sviluppato piometra dopo 30 giorni dalla prima somministrazione del farmaco, ed è stata sottoposta immediatamente ad un intervento di ovarioisterectomia.

Per le tre gatte trattate con megestrolo acetato, invece, vi sono purtroppo pochi dati per stimare una media affidabile della durata dell'efficacia del prodotto. Ad ogni modo, Giulia (n°2) è stata trattata per 45 giorni consecutivi ed è tornata in calore dopo 43 giorni dalla sospensione della somministrazione del prodotto (per una durata totale dell'effetto di 88 giorni). Gigia (n°10) ha assunto il farmaco per 75 giorni ed ha iniziato a manifestare i primi segni estrali dopo 29 giorni dalla sospensione (durata totale: 104 giorni). In media dunque la durata dell'effetto residuo del farmaco dopo l'interruzione della somministrazione è stata di 36 giorni. Tequila (n°9) è stata trattata per 82 giorni, a partire da metà marzo, e non è ancora tornata in calore. Il proprietario aveva notato un miagolio particolarmente intenso ad inizio agosto, ma questo evento si è rivelato solamente un episodio isolato della durata di un'unica giornata, e la gatta è ritornata subito in fase di quiescenza riproduttiva. All'ultima visita effettuata a fine ottobre (a circa 230 giorni dalla prima somministrazione di megestrolo acetato), lo striscio vaginale presentava ancora un quadro citologico tipico dell'anestro (prevalenza di cellule parabasali) e la gatta non aveva ancora dato segni di ripresa dell'attività ciclica.

Su tre delle dieci gatte appartenenti allo studio è stato inoltre possibile valutare la fertilità post-trattamento. Il soggetto n°1 (Shy) e n°2 (Giulia) sono state fatte accoppiare rispettivamente al primo e al secondo calore dopo la cessazione dell'effetto contraccettivo del farmaco. Entrambe hanno concepito e partorito senza alcuna complicazione tre e quattro gattini sani e vitali. Anche Luna (n°5) è stata fecondata con successo al primo calore post-trattamento e ha concepito quattro gattini; purtroppo il proprietario non desiderava avere dei cuccioli dal proprio animale e ha richiesto ugualmente l'ovarioisterectomia, eseguita all'ultima visita di controllo a circa un mese dal ritorno in calore e dall'accoppiamento.

Nella Tabella n°9 sono riportati gli intervalli trattamento-ritorno in calore per ciascuna gatta appartenente allo studio.

GATTA	TRATTAMENTO	DOSE	DURATA TRATTAMENTO	DATA PRIMA SOMMINISTRAZIONE	DATA RITORNO IN CALORE	DURATA EFFICACIA
1	Proligestone	33 mg/kg	Unica iniezione	30/06/2014	25/02/2015	240 giorni
2	Megestrol acetato	0,012 mg/kg/die	45 giorni	02/10/2014	29/12/2014	88 giorni
3	Proligestone	20 mg/kg	Unica iniezione	21/01/2015	?	-
4	Proligestone	20 mg/kg	Unica iniezione	29/01/2015	30/09/2015	244 giorni
5	Proligestone	20 mg/kg	Unica iniezione	30/01/2015	01/06/2015	122 giorni
6	Proligestone	20 mg/kg	Unica iniezione	12/02/2015	10/07/2015	148 giorni
7	Proligestone	20 mg/kg	Unica iniezione	04/03/2015	09/04/2015 (piometra)	30 giorni
8	Proligestone	20 mg/kg	Unica iniezione	05/03/2015	30/09/2015	209 giorni
9	Megestrol acetato	0,010 mg/kg/die	82 giorni	18/03/2015	?	-
10	Megestrol acetato	0,011 mg/kg/die	75 giorni	25/03/2015	07/07/2015	104 giorni

Tabella n°9 - Stima dell'intervallo trattamento-ritorno in calore in 10 gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck) e con megestrol acetato (Estropill®, Merck), ottenuto calcolando i giorni intercorsi tra la data della prima somministrazione del progestinico e la data indicativa fornita dal proprietario in cui l'animale ha ricominciato a manifestare i segni tipici dell'estro. Nella tabella sono riportati il principio attivo con cui è stato trattato ogni soggetto, la dose/kg, la durata complessiva del trattamento, la data della prima somministrazione e del ritorno in calore, e la durata totale dell'effetto contraccettivo.

3.7 OVARIOISTERECTOMIA ED ESAME ISTOLOGICO

Su sei delle dieci gatte partecipanti allo studio (n°4, 5, 6, 7, 8 e 10) si è potuta eseguire un'ovarioisterectomia ed un'analisi istologica dell'apparato riproduttore. Le gatte non hanno manifestato alcuna complicazione né dal punto di vista anestesilogico o chirurgico, né nel post-operatorio, e si sono riprese perfettamente dall'intervento nel giro di pochi giorni.

Dal punto di vista macroscopico, l'ovaio e l'utero di tutte le gatte sterilizzate si sono presentati nei limiti della norma per quanto riguarda le dimensioni e la morfologia generale. Le ovaie, di piccole dimensioni, lasciavano a malapena intravedere piccoli follicoli traslucidi in via di accrescimento, mentre l'utero appariva di colore rosato-rossastro, con le corna di andamento longilineo di 4-5 cm di lunghezza e di diametro costante (0,5 cm circa) (Figura n°11 a).

Fanno eccezione l'utero della gatta n°5 (Luna), gravida di circa un mese, in cui apparivano già ben evidenti e distinti i quattro feti, e n°7 (Bianchina), affetta da piometra. In quest'ultimo caso, l'organo si presentava enormemente ingrandito e dilatato, di colorito più pallido, e dall'aspetto irregolare, con aree più ampie dal contenuto liquido semi-fluttuante, e altre zone meno ectasiche e di consistenza aumentata (Figura n°11 b).



Figura n°11 - Apparato riproduttore di due gatte trattate con proligestone (Covinan®, Merck), prelevato dopo ovariectomia. La figura **a.**, appartenente al soggetto n°4, rappresenta un esempio di utero e ovaie macroscopicamente nella norma. La figura **b.**, invece, riporta l'immagine dell'apparato riproduttore del soggetto n°7 affetto da piometra, di aspetto irregolare, colore pallido e volume notevolmente aumentato.

Dal punto di vista microscopico, nella maggior parte dei campioni analizzati il parenchima ovarico e uterino si sono rivelati nei limiti istopatologici della norma. Nei soggetti n°4, n°8 e n°10 sono stati riscontrati follicoli ovarici in diverso stadio di maturazione, compatibili con la ripresa dell'attività riproduttiva, mentre le ovaie della gatta n°6 sono risultate caratterizzate dall'assenza di follicoli e corpi lutei, e dalla prevalenza di epitelio di superficie ed un mesenchima scarsamente differenziato (tessuto ovarico atrofico). Nella gatta n°5 (gravida al momento del prelievo degli organi riproduttori) si sono potuti apprezzare numerosi corpi lutei di notevoli dimensioni (corpi lutei gravidici).

Anche l'utero in quasi tutte le gatte è stato giudicato rientrare nei range della normalità: la mucosa, di spessore regolare, conferiva al lume un aspetto stellato, e le ghiandole endometriali, più o meno sviluppate, apparivano lineari e con l'epitelio tubulare di altezza minima e monostratificato. Nella gatta n°6, in cui si era riscontrato un certo livello di atrofia ovarica, anche il grado di sviluppo ghiandolare è risultato ridotto, e nel preparato le sezioni sia longitudinali che trasverse delle ghiandole sono emerse in numero più esiguo rispetto alle altre gatte. Nella gatta n°5 sono stati rilevati i siti placentari nel punto di sviluppo dei feti; il resto del parenchima uterino è risultato assolutamente normale. Solo nella gatta n°7 si è potuta constatare un'alterazione patologica, ovvero un'iperplasia endometriale cistica associata ad endometrite purulenta. Il lume uterino si presentava assai più dilatato e di aspetto irregolare, con mucosa diminuita di spessore e contenuto purulento in abbondante quantità (neutrofili, macrofagi e globuli rossi). L'epitelio ghiandolare iperplastico ed ipertrofico era caratterizzato da cellule cilindriche ingrandite, e il lume stesso delle ghiandole era contorto, ectasico e repleto di pus. L'interstizio e la lamina propria mostravano un notevole infiltrato linfoplasmacellulare, con linfociti, plasmacellule e sporadici macrofagi e neutrofili. Infine, nella sottomucosa spiccavano innumerevoli dilatazioni cistiche di forma tondeggianti o ovalari, senza coinvolgimento dello strato muscolare circostante.

Le Figure n°12, 13, 14, 15 e 16 raffigurano alcuni degli esempi di preparato istologico di utero e ovaie tratti dalla documentazione fotografica raccolta nel corso dello studio.

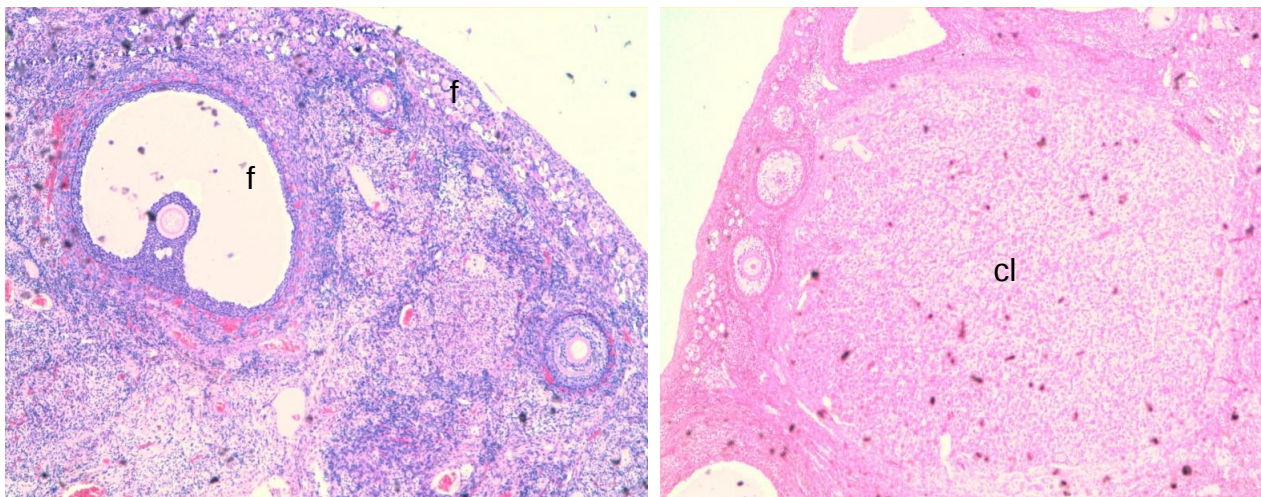


Figura n°12 - Preparato istologico, sezione di ovaio. Nella foto di sinistra, tratta dall'apparato riproduttore del soggetto n°4, trattato con proligestone (Covinan®, Merck), è possibile apprezzare numerosi follicoli in diversi stadi di sviluppo (**f.**); nella foto di destra, appartenente al soggetto n°5 trattato anch'esso con proligestone (Covinan®, Merck), è ben visibile uno dei corpi lutei gravidici (**cl.**). (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 4x)

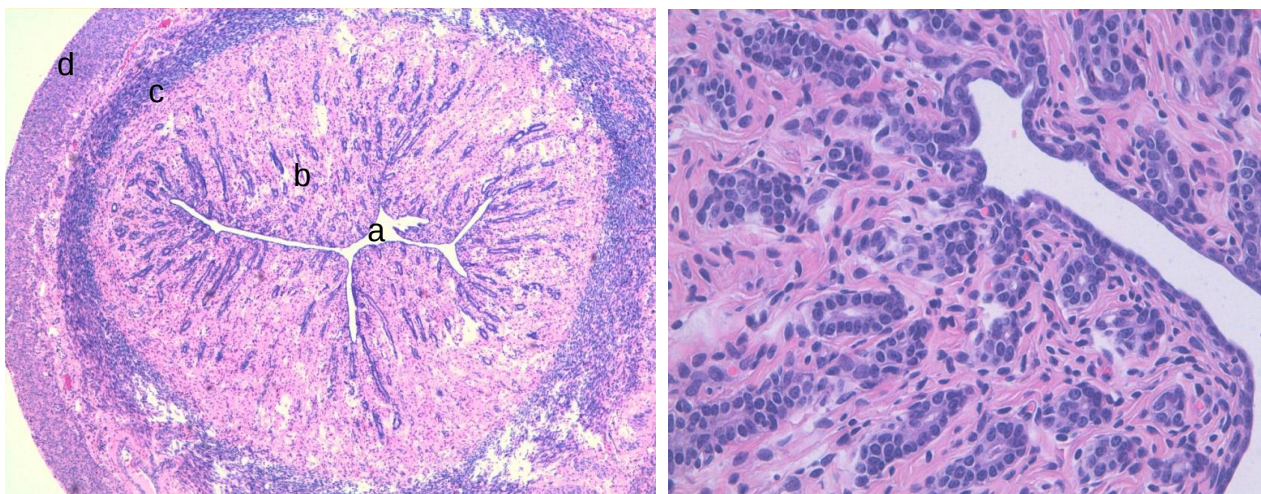


Figura n°13 - Preparato istologico, sezione di utero sano, prelevato dal soggetto n°8 trattato con proligestone (Covinan®, Merck). Nella foto di sinistra è visibile il lume uterino non dilatato, dalla caratteristica forma stellata (**a.**); nella sottomucosa si possono notare numerose ghiandole tubulari semplici (**b.**); tutt'intorno si possono apprezzare le fibre muscolari dello strato miometriale circolare (**c.**) e longitudinale più esterno (**d.**). La foto di destra mostra nel dettaglio la mucosa uterina con diverse sezioni longitudinali e trasversali delle ghiandole endometriali. I tubuli appaiono semplici e lineari, con epitelio cuboidale monostratificato. (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 4x e 40x)

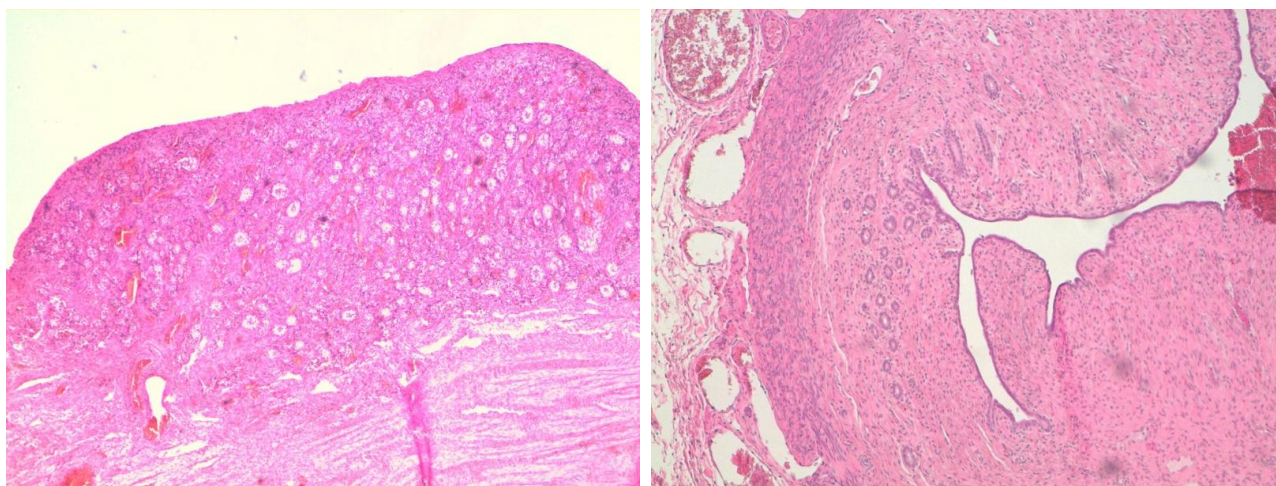


Figura n°14 - Preparato istologico, sezione di utero e ovaio sani, prelevati dal soggetto n°6, trattato con proligestone (Covinan®, Merck). Nella foto di sinistra è raffigurato l'ovaio, caratterizzato da atrofia del parenchima che appare privo sia di follicoli in via di sviluppo che di corpi lutei. Nella foto di destra si può notare come anche le ghiandole endometriali risultino molto meno numerose e sviluppate rispetto al soggetto precedente. (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 4x e 10x)

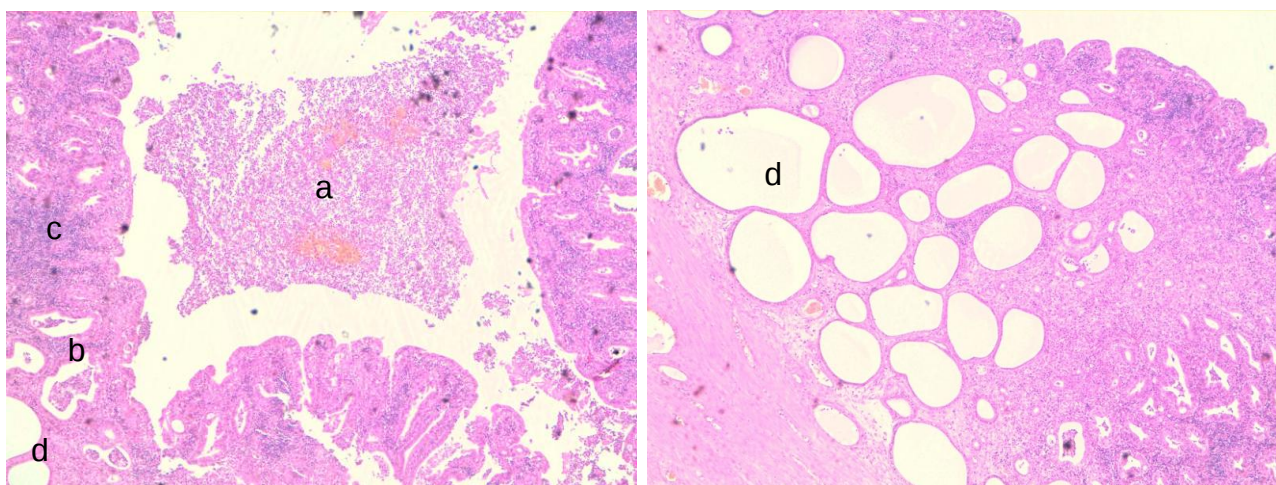


Figura n°15 - Preparato istologico, sezione di utero patologico, prelevato dal soggetto n°7 trattato con proligestone (Covinan®, Merck). Esempio di iperplasia endometriale cistica con endometrite purulenta. Nella foto di sinistra è rappresentato il lume uterino enormemente dilatato e con contenuto purulento (neutrofili, macrofagi e globuli rossi) (a.). Anche la mucosa appare iperplastica e degenerata: le ghiandole endometriali risultano più ramificate, di dimensioni maggiori e anch'esse con contenuto luminale purulento (b.); l'interstizio presenta un infiltrato di tipo linfoplasmacellulare (c.); nella sottomucosa sono visibili numerose formazioni cistiche di varie dimensioni (d.). La foto di destra mostra un dettaglio delle cisti endometriali. (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 4x)

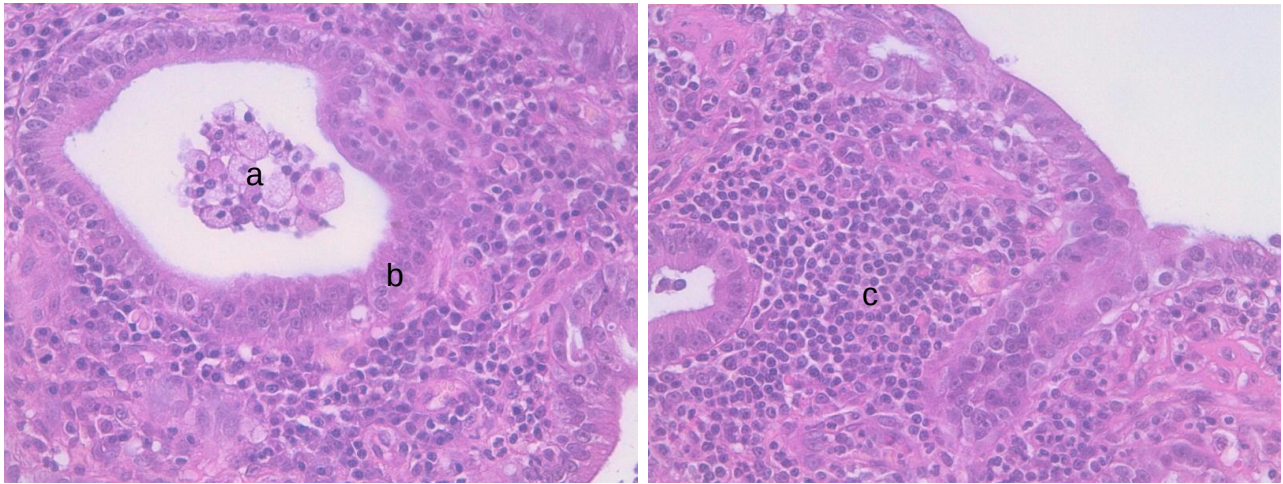


Figura n°16 - Preparato istologico, sezione di utero patologico prelevato dal soggetto n°7 trattato con proligestone (Covinan®, Merck). Esempio di iperplasia endometriale cistica con endometrite purulenta. Nella foto di sinistra è rappresentato un dettaglio di una ghiandola endometriale. Il lume è ectasico e repleto di materiale purulento (neutrofili e macrofagi) (**a.**), mentre l'epitelio ghiandolare appare iperplastico e pluristratificato (**b.**). Nella foto di destra invece si può apprezzare l'infiltrato linfoplasmacellulare interstiziale (**c.**). (colorazione: ematossilina-eosina; ingrandimento: 40x)

4. DISCUSSIONE

Lo studio condotto su dieci gatte intere post-puberi trattate con proligestone iniettabile (Covinan®, Merck) alla dose di 20 mg/kg in un'unica iniezione sottocutanea, o con megestrolo acetato (Estropill®, Merck) alla dose di 5 gocce/kg/die (0,010-0,012 mg/kg/die) per 6-10 settimane, ha permesso di valutare l'effetto di tali prodotti sui parametri fisiologici (stato di salute generale, peso, esami ematobiochimici), riproduttivi (livelli ematici di progesterone ed estradiolo, grado di cheratinizzazione dell'epitelio vaginale, aspetto ecografico ed istologico del tratto genitale) e comportamentali degli animali sottoposti a trattamento. La terapia progestinica attuata è risultata efficace in tutti i soggetti studiati, permettendo un efficiente controllo del ciclo riproduttivo già dai primi giorni post-somministrazione.

Visita clinica

Alla luce dei numerosi studi riguardanti i possibili effetti collaterali dei farmaci progestinici (Romagnoli e Sontas, 2010), si è deciso di monitorare con attenzione lo stato di salute generale delle gatte nel corso della sperimentazione. Tutti i soggetti inclusi nella ricerca hanno preservato le loro buone condizioni fisiche di partenza, mantenendo uno sviluppo scheletrico e tonicità muscolare, stato del sensorio, elasticità della cute, mucose, linfonodi e caratteri del polso e del respiro ottimali durante tutto il periodo sperimentale.

Particolare attenzione è stata rivolta alla cute dell'animale, soprattutto nel punto di inoculo per le gatte trattate con proligestone. La letteratura riporta infatti, tra i possibili effetti indesiderati della somministrazione sottocutanea di progestinici, la possibilità di sviluppo di atrofia cutanea, xantomatosi, alopecia e decolorazione del pelo (Nelson, 1977; Kwochka e Short, 1984; Chen e Bellenger, 1987; Henik et al., 1987). Un caso di calcinosi circumscripta è stato inoltre segnalato in un gatto Burmese di 9 mesi dopo 4 mesi dall'iniezione di 100 mg di proligestone (O'Brien e Wilkie, 2001). Nei soggetti studiati non è stata rilevata alcuna anomalia cutanea; solamente la gatta n°4 ha presentato all'ultima visita (dopo circa 9 mesi dal trattamento) una zona di decolorazione del pelo di circa un paio di centimetri sulla coscia destra in corrispondenza del punto di inoculo di proligestone. In realtà tra la terza e la quarta e ultima visita sono intercorsi ben 5 mesi, per cui non è possibile definire con precisione il momento esatto di comparsa di tale ritrovamento, e se ci si trovi di fronte ad una modificazione a lungo termine o meno. Inoltre

si tratta dell'unica gatta in cui l'iniezione è stata fatta sulla coscia anziché nella regione interscapolare, dunque risulta difficile stabilire, non avendo altri animali trattati in egual maniera per il confronto, se questo effetto sia in qualche modo legato alla sede di iniezione (ad esempio per una maggiore sensibilità cutanea) o semplicemente alla sensibilità soggettiva della gatta in questione. Finora non è stato segnalato in letteratura alcun altro caso di decolorazione del pelo in seguito ad iniezione sottocutanea di proligestone.

Peso

Una costante che ritorna in molti degli studi condotti sull'uso di progestinici nel cane e nel gatto è sicuramente l'aumento dell'appetito e della letargia che risultano in un incremento di peso corporeo (Chen e Bellenger, 1987; Henik et al., 1987; Baldwin et al., 1994). Nel nostro caso, basandosi sulle impressioni dei proprietari, non è stato riscontrato alcun particolare aumento di frequenza o quantità di assunzione dell'alimento se non in un'unica gatta (n°9). A conferma di ciò, né l'analisi della varianza delle medie del peso stimate nelle varie classi di distanza, né lo studio della regressione lineare tra le due variabili "peso" e tempo dal trattamento" hanno confermato una differenza significativa della variazione di questo parametro.

C'è da notare che in certi soggetti si è notata comunque una moderata tendenza all'aumento del peso, pur tenendo conto che in alcuni casi ci si trovava di fronte ad animali in accrescimento, e che non avevano quindi ancora raggiunto il loro peso ideale da adulto (non a caso l'aumento più importante si è registrato proprio nel soggetto più giovane, la gatta n°6). È da tener conto comunque che il numero di animali sperimentali risulta estremamente limitato (soprattutto per il gruppo di trattamento con megestrolo acetato, che conta solamente tre gatte), per cui è possibile che un campione più ampio avrebbe permesso di ottenere dei risultati differenti.

Un limite di questo studio può essere rappresentato dal fatto di non aver avuto un gruppo di controllo, formato da gatte della stessa razza ed età di quelle sperimentali, in cui si fosse monitorato l'accrescimento per un periodo pari a quello dello studio, senza però somministrare loro alcun farmaco. Il parametro del peso può essere influenzato inoltre anche da altri fattori quali il periodo dell'anno, la temperatura ambientale, le abitudini comportamentali, la possibilità di accesso all'esterno e il tipo e modalità di alimentazione. Essendo questi fattori estremamente eterogenei tra gli animali testati, è possibile che l'aumento di peso corporeo, nelle gatte in cui è stato rilevato, non sia solo un possibile

frutto del puro trattamento progestinico ma bensì il risultato di una somma di tutte queste variabili considerate.

Ghiandole mammarie

Tra gli effetti collaterali più temuti, associati all'uso di progestinici anche per brevi periodi, vi sono sicuramente le ripercussioni a livello mammario. In particolar modo per il megestrolo acetato, in commercio da più anni e quindi oggetto di studio di numerosi lavori scientifici, sono stati riportati molteplici casi di iperplasia mammaria benigna e carcinomi mammari se utilizzato a dosi elevate per periodi di tempo prolungati (0,625-1,25 mg/kg/die per più anni) (Hernandez et al., 1975; Hinton e Gaskell, 1977; Purkay e Stevenson, 1983; Tomlinson et al., 1984; Hayden et al., 1989; MacDougall, 2003). Per il proligestone è riportato invece solamente un caso di un gatto Maine Coon di 7 mesi che ha sviluppato iperplasia mammaria benigna dopo due mesi da un'unica iniezione di 17,8 mg/kg (Vitasek e Dendisova, 2006).

Nel nostro studio sono state impiegate dosi inferiori a quelle universalmente riportate in letteratura, sia di megestrolo acetato (0,010-0,012 mg/kg/die) che di proligestone (20 mg/kg), per un lasso di tempo limitato (7-10 settimane per il primo, un'unica iniezione per il secondo), e solamente in animali post-puberi. Dal momento che l'iperplasia mammaria è una patologia legata quasi esclusivamente al primo calore e difficilmente tende a ripetersi in quelli successivi, il fatto di aver selezionato animali che avessero già sperimentato almeno una volta la fase estrale ha dato la possibilità di discernere l'origine ("parafisiologica" piuttosto che "farmacologica") di tale anomalia nel caso essa si fosse presentata.

In questo studio non si sono tuttavia riscontrate anomalie di alcun genere a livello mammario. Solamente il soggetto n°10, trattato con megestrolo acetato per 10 settimane, a 4 mesi dalla prima somministrazione del farmaco, presentava un lieve aumento del volume e della consistenza del parenchima mammario (soprattutto a livello dell'ultimo paio di mammelle addominali e della coppia di inguinali), risoltosi spontaneamente subito dopo la sterilizzazione. È da considerare però che in corrispondenza dell'ultima visita, momento in cui è stata rilevata l'anomalia, l'effetto contraccettivo del farmaco si era esaurito e la gatta era tornata in calore da 13 giorni (come confermato anche dalla colpocitologia e dall'istologia ovarica). Non si può escludere quindi la possibilità che l'aumento del parenchima mammario sia legato principalmente alla fase estrale e alla variazione di concentrazione di ormoni endogeni anziché al megestrolo acetato in sé: sia estrogeni che progesterone contribuiscono infatti fisiologicamente alla crescita e allo sviluppo della

ghiandola mammaria. A supporto di questa ipotesi vi è anche il fatto che le mammelle della gatta siano ritornate alla normalità appena dopo l'ovarioisterectomia, operazione che ha di fatto eliminato qualsiasi possibile influenza ormonale endogena. L'entità dell'ingrandimento mammario in questo soggetto non è stato comunque giudicato tale da rientrare in una modificazione patologica ed rivelarsi quindi preoccupante per la salute dell'animale. Va inoltre riportato che la gatta, durante i 4 mesi di sperimentazione, è aumentata considerevolmente di peso (da 3,1 kg a 3,8 kg), per cui la rilevante infiltrazione adiposa può aver contribuito alla percezione dell'incremento del parenchima mammario.

Profilo biochimico

Per quanto riguarda gli esami ematobiochimici, non vi è alcun riferimento in letteratura su una possibile influenza dei trattamenti progestinici nei confronti dei parametri ematici, se non la possibilità di sviluppare iperglicemia per la loro azione di tipo glucocorticoide e la possibile insorgenza di insulino-resistenza e diabete mellitus, nella maggior parte dei casi reversibile dopo sospensione del trattamento (Pukay, 1979; Middleton et al., 1987; Peterson, 1987; Watson et al., 1989). È stato segnalato anche un caso di iperlipidemia e cecità bilaterale reversibile un gatto di 2 anni trattato per dieci mesi con megestrolo acetato (dose sconosciuta) (Ghaffari, 2008). Nessuna di queste due condizioni è stata riscontrata nel nostro studio.

Il nostro protocollo sperimentale prevedeva degli esami del sangue completi ad ogni visita, con l'animale possibilmente a digiuno. Non sempre però quest'ultima condizione è stata assicurata dal proprietario, dal momento che molte delle gatte trascorrevano la maggior parte della giornata all'esterno e non erano facilmente controllabili per quanto riguarda l'assunzione di cibo. Inoltre alcuni dei soggetti, soprattutto quelli che vivevano allo stato semi-brado e che non risultavano facilmente manipolabili, una volta catturati sono rimasti rinchiusi nel trasportino anche per diverse ore prima di esser portati in clinica, per cui esiste la possibilità che stress e disidratazione possano aver alterato alcuni dei parametri ematici. In generale, per quanto riguarda l'esame biochimico, gli unici valori sensibilmente al di sopra o al di sotto dei range di normalità sono risultati essere la fosfatasi alcalina, l'albumina e le proteine totali, la glicemia e la CK. Di fronte alla normalità degli altri valori epatici, l'aumento di ALP può essere considerato fisiologico negli animali giovani o in caso di emolisi del campione. Non si è riusciti a trovare una spiegazione alle sempre più elevate concentrazioni di tutti gli enzimi epatici riscontrata invece nella gatta n°8, pur essendo clinicamente ed ecograficamente sana. Anche nella gatta n°5 l'ALT è andata via via aumentando nelle visite successive, ma di fronte alla normalità dei restanti parametri di

funzionalità epatica si può pensare di associare questa anomalia principalmente ad una sofferenza muscolare (da eccitazione). L'elevata concentrazione di albumina e proteine totali che caratterizza pressoché tutti i soggetti può essere ricondotta ad un artefatto da lipemia o emoconcentrazione (lieve disidratazione). Il livello maggiore della glicemia nel soggetto n°5 può essere imputato allo stress del prelievo stesso o al fatto che l'animale potesse non esser stato a digiuno; viceversa, la moderata ipoglicemia nelle restanti gatte può essere stata causata da un artefatto da prolungato contatto del siero con gli eritrociti (non sempre infatti si è potuto centrifugare il campione dopo solo un quarto d'ora dal prelievo). Infine il marcato aumento in quasi tutte le gatte della CK, legata generalmente a danno muscolare, può essere ricondotta ai tremori da stress o alle iniezioni intra-muscolari della sedazione, laddove è stata eseguita.

Le variazioni che sono risultate statisticamente significative riguardano solamente quattro parametri: albumina, proteine totali, creatinina e colesterolo. In particolare, si possono distinguere due sottoinsiemi di variazioni delle medie di questi valori ematici. Nel primo sottoinsieme sono state collocate le alterazioni significative che con buona probabilità non sono riconducibili al trattamento effettuato: ne fanno parte i parametri "proteine totali" e "colesterolo". Il colesterolo, ad esempio, pur rientrando nei limiti fisiologici in tutti i soggetti, è risultato mediamente più elevato nelle gatte appartenenti al gruppo di trattamento con megestrolo acetato rispetto a quello di proligestone già a partire dalla prima visita (valore medio: 138 vs 115 mg/dl), tendenza che si è mantenuta anche in tutti i controlli successivi. La stessa situazione caratterizza le proteine totali, mediamente più elevate nelle gatte trattate con proligestone piuttosto che con megestrolo acetato (valore medio: 72,58 vs 67,09 g/dl). Dal momento che a T0 (prima visita) gli animali non erano ancora stati trattati e che quindi il farmaco non poteva aver ancora influenzato il metabolismo del soggetto, è probabile che questa variazione dipenda esclusivamente dal gruppo di gatte casualmente selezionate per lo studio. È possibile quindi che con un campione più ampio si possano ottenere dei risultati differenti.

Nel secondo sottoinsieme sono invece state incluse quelle variazioni che sembrano dimostrare una relazione con il tipo di farmaco utilizzato: ne fanno parte i parametri "albumina" e "creatinina". L'albumina varia significativamente solo nel gruppo di soggetti trattati con proligestone, diminuendo la sua concentrazione media con l'aumentare della distanza dal trattamento (da 31,62 a 26,96 g/dl); questo non avviene invece per il trattamento con megestrolo acetato. Alla luce di questi risultati, si può ipotizzare che il proligestone presenti una certa affinità per l'albumina come proteina plasmatica di

trasporto, ed essendo un farmaco a lento rilascio, possa nel tempo saturarne progressivamente i legami, riducendone quindi la quota libera. Questa teoria è supportata da uno studio condotto in ambito medico umano sul metabolismo e le proprietà farmacologiche di certi progestinici usati come contraccettivi nella donna (Schindler et al., 2008). Esso dimostra come certi composti progestinici possano legarsi a diverse tipologie di proteine plasmatiche: il megestrolo acetato, ad esempio, nell'uomo viene trasportato quasi esclusivamente dalle albumine, mentre il medrossiprogesterone acetato può legare in minima parte anche altre proteine quali l'SHBG (*sex hormone-binding globulin*) e la CBG (*corticosteroid-binding globulin*); non vi è alcun riferimento per quanto riguarda il comportamento del proligestone, in quanto questo principio attivo non viene utilizzato in medicina umana. È interessante notare come i risultati del nostro studio sembrano suggerire una marcata affinità del proligestone per le albumine plasmatiche, al contrario del megestrolo acetato, in cui il loro valore medio non sembra diminuire dopo il trattamento. Il calo significativo delle proteine totali che caratterizza gli animali trattati con megestrolo acetato non è quindi legato alla quantità di albumine e si può supporre che questo progestinico nella gatta affidi il suo trasporto ematico ad altre tipologie di proteine plasmatiche come ad esempio le globuline: due (n°2 e n°10) delle tre gatte sottoposte a questa terapia presentano in effetti concentrazioni di globuline mediamente più basse, seppur non significativamente minori, rispetto alle altre gatte dello studio.

Infine la creatinina, pur rimanendo mediamente entro i range di normalità, risulta significativamente più elevata nel gruppo di trattamento con megestrolo acetato nella prima (1,47 vs 1,21 mg/dl) e terza classe di distanza (1,72 vs 1,40) rispetto alle altre gatte trattate con proligestone. Di fronte alla normalità degli altri parametri renali, si può attribuire questo suo aumento ad una maggiore produzione in sede muscolare. La ragione di questa aumentata produzione non è chiara; si può pensare di attribuirla ad una maggiore attività muscolare, in quanto alla prima visita la gatta non era ancora stata trattata con il progestinico, mentre all'ultima visita è corrisposto il ritorno in calore e la ripresa dell'attività riproduttiva. Il periodo di piena efficacia del farmaco (rappresentato dalla seconda classe di distanza) può quindi esser stato interessato da una riduzione dell'attività dell'animale, e di conseguenza da una minor produzione di creatinina. Il proligestone, per contro, sembra non aver inciso sulla diminuzione dei livelli di creatinina, sebbene un maggior grado di sedentarietà sia stato riportato anche in alcune delle gatte trattate con questo farmaco.

Profilo ematologico

Per quanto riguarda il profilo ematologico, non vi sono state variazioni statisticamente significative in nessuno dei parametri. Gli unici valori al di fuori del range di normalità hanno interessato principalmente l'MCHC e l'HDW, che va di pari passo con il possibile leggero grado di disidratazione di certi animali, mentre la variazione di tutti gli altri indici eritrocitari, di fronte ad un animale clinicamente sano, fa propendere più verso un artefatto da emolisi (per prolungato contatto del siero con la parte corpuscolata o per modalità di prelievo troppo "invasive"). Il leggero stato di anemia riscontrato alla prima visita nei soggetti n°5 e n°9 e mai più ripresentatosi è probabilmente un reperto occasionale, invece la trombocitosi ritrovata nelle gatte n°1, 7, 8 e 10 può essere imputata alla contrazione splenica, evento fisiologico in caso di stress ed eccitazione. Più di metà dei soggetti ha manifestato alla prima visita neutropenia e linfocitosi, in alcuni casi persistenti e aggravatisi alle visite di controllo successive. Questa anomalia è imputabile a delle infezioni subcliniche, anche se non è da dimenticare che l'aumento dei linfociti può essere anche correlato al grado di eccitazione e stress (risposta adrenergica), molto più probabile in questi casi di soggetti clinicamente sani. Infine, il valore superiore al range fisiologico degli eosinofili ritrovato in tre soggetti (n°3, 8 e 9) può essere legato alla presenza di parassiti (ad esempio due di questi tre soggetti non hanno mai ricevuto alcun trattamento antelmintico).

Dosaggio ormonale

Il dosaggio di progesterone ed estradiolo ha permesso di valutare l'efficacia effettiva dei farmaci utilizzati. Per quanto riguarda il progesterone, in assenza di ovulazione e formazione di corpi lutei funzionanti (e quindi in una fase di quiescenza riproduttiva), esso si dovrebbe mantenere generalmente inferiore ai 0,5 ng/ml (Feldman e Nelson, 1996); i risultati di questo studio hanno confermato tale affermazione. Tutte le gatte sono partite alla prima visita già con valori minimi di P4 compresi tra 0,2 e 0,5 ng/ml per giungere già dopo un mese concentrazioni addirittura più basse di quelle basali (< 0,2 ng/ml). Solamente nel soggetto n°3 il progesterone si è sempre mantenuto ad un livello costante di 0,5-0,6 ng/ml, compatibile comunque con i livelli tipici della fase anestrale. Fa eccezione il soggetto n°7 (di cui si discuterà in una sezione a parte alla fine di questo capitolo), che presentava una concentrazione di P4 iniziale di 1,3 ng/ml.

Sebbene non vi siano differenze statisticamente significative tra la progesteronemia media alle diverse classi di distanza o tra gruppi di trattamento, la permanenza ai valori minimi dell'ormone permette, se non di escludere con certezza la presenza di attività ovarica

residua, di confermare perlomeno l'assenza di ovulazione (e conseguente formazione di corpi lutei che produrrebbero $P_4 > 1-2$ ng/ml). Essendo la gatta nella maggior parte dei casi una specie ad ovulazione indotta, la mancanza di ovulazione può essere ricondotta direttamente all'assenza di accoppiamento e quindi ad un'inattività riproduttiva (in questi casi molto probabilmente indotta dal farmaco).

L'estradiolo è stato valutato e interpretato come indicatore di follicologenesi. In uno stato di quiescenza ovarica la sua concentrazione ematica non dovrebbe infatti superare i 10-15 pg/ml; viceversa, con livelli > 20 pg/ml si può presupporre un certo livello di attività follicolare (Feldman e Nelson, 1996). Dalla seconda visita in poi è stato quindi eseguito un test di stimolazione con un analogo del GnRH (Fertagyl®, Intervet) per valutare il grado di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.

Nel 2008 alcuni ricercatori svedesi hanno condotto uno studio su di un gruppo di 22 gatte (11 intere e 11 sterilizzate) ai fini di discernere la presenza o meno delle ovaie tramite la misurazione della concentrazione ematica di estradiolo e progesterone prima e dopo stimolazione con buserelin, analogo del GnRH (Axnér et al., 2008). Da questa ricerca è risultato che, mentre i livelli di progesterone rimanevano basali in tutte le gatte, quelli di estradiolo aumentavano significativamente dopo stimolazione con GnRH solamente nel gruppo di gatte intere e non in quello di gatte sterilizzate. In particolare il valore massimo di estradiolo registrato in quest'ultimo gruppo è stato di 9 pmol/L (circa 2,45 pg/ml).

Nel nostro studio i risultati sono stati invece eterogenei ed in parte discordanti con lo studio citato in precedenza. In generale, la concentrazione media dell'estradiolo ha manifestato un andamento altalenante, sfiorando i livelli minimi (< 20 pg/ml) solamente in quattro soggetti (n°4, 6, 9 e 10), e rimanendo sempre compresa tra i 30 e i 70 pg/ml nelle restanti gatte. Solamente nel soggetto n°6 i livelli di E₂ si sono sempre mantenuti costantemente al di sotto dei 20 ng/ml ad ogni visita. Non è risultato possibile quindi comparare le concentrazioni ematiche di estradiolo di gatte sterilizzate con quelle di gatte indotte in anestro farmacologicamente (in questo caso mediante l'uso di progestinici), poiché in quest'ultime sembra comunque persistere un certo grado di funzionalità ovarica. Nel nostro caso è stata formulata l'ipotesi che la dose di proligestone utilizzata, volutamente più bassa rispetto a quella comunemente riportata in letteratura, possa non aver indotto il massimo grado di soppressione ipotalamica come avrebbe potuto fare una dose piena, consentendo un determinato livello di sviluppo follicolare (con conseguente produzione di estrogeni). La produzione di GnRH non deve esser stata ad ogni modo sufficiente a consentire il rilascio di livelli di FSH ed LH tali da indurre lo sviluppo finale dei

follicoli e le manifestazioni estrali ad esso correlate: le gatte infatti non hanno mai mostrato alcun segno di calore durante l'arco dello studio, pur presentando valori di E2 talvolta anche molto elevati. Valutando la regressione lineare, non si è riscontrata alcuna correlazione tra la distanza dal trattamento e la distribuzione della concentrazione di estradiolo nelle gatte trattate con proligestone. Solo nella gatta n°6 la soppressione ipotalamo-ipofisaria sembra esser stata completa (confermata anche dall'atrofia ovarica rilevata all'esame istologico). Valori così variabili e altalenanti di E2 possono essere ricondotti alla secrezione pulsatile fisiologica di GnRH e gonadotropine; probabilmente esami del sangue più ravvicinati nel tempo ed eventualmente eseguiti pre- e post-stimolazione con GnRH avrebbero permesso di delineare un quadro più dettagliato dell'andamento della concentrazione di estradiolo e del grado di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.

Diversa è la situazione che ha caratterizzato il gruppo di gatte testate con megestrolo acetato. Sebbene somministrato anch'esso ad una dose minimale, la soppressione ipotalamica sembra esser stata progressiva e completa, dal momento che la concentrazione di E2 è andata via via calando fino a raggiungere livelli basali < 20 pg/ml in corrispondenza delle ultime visite in entrambe le gatte trattate con questo farmaco. In questo caso, allo studio della regressione lineare, si può apprezzare una correlazione negativa tra distanza dal trattamento e concentrazione ematica di estradiolo ($R^2 = 0,464$). Tuttavia questa valutazione si basa sui dati ottenuti da solo due soggetti, per cui si ritiene necessario un campione più ampio per confermare o smentire questo risultato.

Colpocitologia

Anche la citologia vaginale ha permesso di monitorare lo stato riproduttivo degli animali sperimentali. Due dei dieci soggetti testati (n°9 e n°10) si trovavano probabilmente nel pieno della fase estrale al momento della prima visita, a giudicare dall'alto tasso di cheratinizzazione dell'epitelio vaginale (rispettivamente 83% e 97%), mentre le restanti gatte dovevano essere in fase di anestro od interestro (per la prevalenza di cellule parabasali o intermedie). Dal momento che il grado di cheratinizzazione ed esfoliazione dell'epitelio vaginale è sotto l'influsso estrogenico, nelle gatte indotte alla quiescenza riproduttiva attraverso l'utilizzo di progestinici ci si aspettava di trovare un quadro citologico paragonabile a quello tipico dell'anestro. Per la maggior parte dei soggetti studiati questa affermazione è stata confermata: si è rilevata infatti una tendenza generale alla diminuzione delle cellule cheratinizzate (al di sotto del 30%) accompagnata da un simultaneo aumento delle cellule non cheratinizzate ($> 70\%$) nell'arco dello studio.

Fanno eccezione la gatta n°3 e n°4, in cui le cellule cheratinizzate sono lievemente aumentate rispetto alla prima visita, ma sempre mantenendosi al di sotto del 30% e rientrando comunque nel quadro citologico anestrato, e la gatta n°6, che invece ha manifestato un comportamento totalmente opposto alla tendenza generale. In questa gatta, infatti, le cellule cheratinizzate sono andate via via aumentando anziché diminuire, raggiungendo picchi di cheratinizzazione del 70-80% alla seconda e terza visita, valori che fanno pensare più ad una fase estrale che anestrato. Al contrario, le sue concentrazioni di estradiolo non hanno mai superato i 20 pg/mol, e la gatta a parere del proprietario non ha mai manifestato segni di calore durante il trattamento. L'inattività sessuale è stata inoltre confermata dall'esame istologico che ha riportato atrofia del parenchima ovarico (la gatta non era dunque ancora tornata in calore all'ultima visita).

In nessuna delle gatte testate vi è in realtà una corrispondenza tra il valore di estradiolo ematico e la percentuale di cheratinizzazione. Il motivo di questa incongruenza non è ancora stato chiarito, e non vi sono riferimenti precisi a riguardo in letteratura. Si può ipotizzare che vi sia una mancanza di sincronia tra la concentrazione ematica dell'ormone e i suoi effetti sugli organi target: in questo caso la cheratinizzazione dell'epitelio vaginale potrebbe avvenire più o meno tardivamente rispetto al momento di comparsa del picco di estradiolo che l'aveva generata, per cui la misurazione ematica di E2 potrebbe aver colto la fase discendente della curva estrogenica mentre la colpocitologia avrebbe fotografato un quadro citologico appartenente ancora alla sua fase ascendente (e viceversa). Una seconda ipotesi potrebbe essere invece legata al grado di sensibilità individuale dell'epitelio vaginale di ciascuna gatta all'azione dell'estradiolo (ad esempio per un numero differente di recettori per gli estrogeni), per cui ogni gatta genera una risposta assolutamente soggettiva e variabile.

Non è un caso che le tre eccezioni sopra citate appartengano al gruppo di gatte trattate con proligestone, e che ancora una volta solamente nel gruppo di sperimentazione del megestrolo acetato si sia rilevata una differenza significativa con il test ANOVA nel calo della percentuale di cellule cheratinizzate nella seconda e terza classe di distanza rispetto alla prima. Questo risultato va di pari passo con l'idea innanzi espressa che questo farmaco abbia di fatto provocato una più efficace soppressione ipotalamica, accompagnata da un calo marcato degli estrogeni circolanti. Il fatto che questo gruppo sia composto da soli due animali (della terza gatta non si hanno dati a riguardo) può rappresentare un limite per queste supposizioni. Non è inoltre possibile stabilire se il fatto che entrambe queste due gatte fossero gli unici due soggetti a trovarsi apparentemente in

piena fase estrale al momento del trattamento possa in qualche modo aver influito sull'insorgenza dell'effetto del farmaco, o se tutto ciò dipenda esclusivamente dalla diversa modalità di azione dei due progestinici (short-acting vs long-acting). Occorrerebbe quindi una popolazione più ampia e omogenea per poter confrontare significativamente il comportamento dei due farmaci.

La quarta tipologia cellulare dei neutrofili, infine, non risulta essere come nella cagna un reperto fisiologico della fase diestrale, per cui anche una loro minima percentuale nello striscio vaginale di gatta fa propendere verso la presenza di una patologia dell'apparato riproduttore. Solo in due (n°4 e n°7) delle dieci gatte studiate sono stati rinvenuti dei neutrofili nei preparati citologici. Per quanto riguarda il soggetto n°4, è stata rilevata una notevole percentuale di neutrofili non degenerati (78%) alla terza visita di controllo, tanto da far sospettare un inizio di piometra, pur in assenza di scolo vaginale. La patologia è stata smentita dopo un'accurata ecografia uterina, in cui non si sono riscontrate irregolarità o accumulo di fluidi alcuno, e dagli esami del sangue, che riportavano i principali parametri ematici nei range della normalità. È possibile imputare questa condizione ad una vaginite subclinica, risoltasi spontaneamente; alla visita successiva infatti non si è più trovata traccia di granulociti polimorfonucleati. Il soggetto n°7, invece, presentava già una modesta percentuale di granulociti neutrofili alla prima visita (34%), possibile indicatore di uno stato di partenza non ottimale dell'apparato riproduttore. Alla visita seguente, dopo un mese dal trattamento, il loro numero era triplicato e lo scolo vaginale purulento stava ad indicare la presenza di una grave infezione uterina.

Ecografia uterina

Alcuni studi dimostrano che, associata al dosaggio ormonale, la migliore e più sensibile tecnica per la valutazione dello stato riproduttivo nella gatta è l'ecografia (Woodland et al., 2014). Non esistono tuttavia specifici studi riguardanti le possibili modificazioni ecografiche riconducibili a trattamenti progestinici. Essendo il tratto genitale uno dei principali tessuti target dell'azione di questi farmaci, si è ritenuto fondamentale andare ad indagare il più accuratamente possibile qualsiasi sua possibile variazione, sia essa fisiologica che patologica. Tramite l'ecografia si è potuto escludere o confermare la presenza di ispessimenti o assottigliamenti della parete, l'aumento o la diminuzione delle dimensioni dell'organo, ed il possibile contenuto luminale anomalo. La condizione ideale per un confronto dei diametri tra le varie visite e fra tutte le gatte dello studio, si sarebbe verificata in caso vi fosse stata la certezza di prendere tali misurazioni ogni volta al medesimo livello

delle corna o del corpo uterino. Purtroppo, essendo questo un organo mediamente mobile, in grado di cambiar posizione e orientamento a seconda del grado di replezione della vescica e del colon che lo circondano, questa condizione difficilmente è stata rispettata. Ad ogni modo, ad eccezione dell'unico soggetto (n°7) che ha sviluppato piometra, non è stata riscontrata alcuna variazione significativa del diametro uterino medio né tra gruppi di trattamento né tra classi di distanza, e l'aspetto ecografico dell'utero di ogni gatta si è mantenuto pressoché costante nel corso dello studio.

Etologia

Anche i risultati dei questionari etologici non hanno mostrato grosse modificazioni circa le principali abitudini comportamentali delle gatte. Bisogna sottolineare il fatto che le osservazioni raccolte rispecchiano le impressioni dei proprietari e molte volte possono essere fuorvianti e non oggettive. Il fatto poi che alcune delle gatte testate vivano allo stato semi-brado e non siano quindi state così strettamente monitorate, fa sospettare della reale affidabilità di certi dati. Nonostante tutto, i questionari ed il dialogo con i proprietari sono stati d'aiuto nel capire quanto i proprietari stessi sappiano effettivamente interpretare i comportamenti sessuali o di altra natura del proprio animale, e quanto percettibile possa essere una loro qualunque modificazione.

Facendo riferimento alla letteratura, ci si aspettava di riscontrare un consistente aumento della letargia, della sedentarietà e dell'appetito (Burke, 1982; Henik et al., 1987). In realtà, solamente tre gatte su dieci sembrano esser state interessate da una riduzione del livello di attività (n°3), del vagabondaggio (n°9) e da un aumento delle ore di sonno (n°6), così come una sola gatta su dieci (n°9) ha mostrato un sensibile aumento dell'appetito. Nel soggetto n°4, per contro, sono aumentate l'attività e l'aggressività, e diminuita d'altro canto la tolleranza alle manipolazioni. Dal momento che non vi sono riferimenti nei lavori antecedenti di una tale evenienza, occorrerebbero ulteriori studi su una popolazione più vasta per capire se questo risultato sia dovuto al caso, o se effettivamente esista la possibilità che i trattamenti progestinici possano, in un individuo già tendente all'aggressivo, esacerbarne anziché attenuarne l'indole. Non è stata riportata poliuria-polidipsia, descritta invece in altri studi (Henik et al., 1987). Le attività di caccia e gioco sembrano non essere per nulla influenzate dallo stato riproduttivo del soggetto.

Le uniche voci del modulo etologico che hanno riscontrato una variazione significativa sono state quelle legate alla sfera sessuale, ed in particolare in tutte le gatte sono scomparsi i segni del calore (rotolamenti, strofinamenti, miagolii) per tutto il periodo del trattamento, in alcune si sono rarefatti i comportamenti di marcatura (ad esempio in

quattro gatte è calata la frequenza di graffiature), e sono diminuite considerevolmente le vocalizzazioni o hanno cambiato finalità (da richiami sessuali a richieste di cibo ed attenzioni). Quest'ultima constatazione si trova pienamente d'accordo con le constatazioni espresse in precedenza circa l'efficacia dei due farmaci nella soppressione dell'estro e del comportamento riproduttivo.

Intervallo trattamento-ritorno in calore

Il calcolo dell'intervallo trattamento-ritorno in calore è stato effettuato sulla base della testimonianza del proprietario circa la ripresa dell'attività riproduttiva dell'animale, e confermato poi con l'ausilio del dosaggio ormonale, della citologia vaginale e dell'esame istologico. In quasi tutti i casi i proprietari sono stati in grado di riconoscere le manifestazioni estrali nella loro gatta, ad eccezione del soggetto n°6, la cui colpocitologia (75% di cellule non cheratinizzate), concentrazione estrogenica (< 20 pg/ml) ed esame istologico (parenchima ovarico atrofico) facevano propendere per uno stato anestrale ancora in corso.

Uno degli scopi di questo lavoro era quello di stabilire la durata dell'efficacia dei due farmaci impiegati se utilizzati ad una dose inferiore a quella comunemente riportata in letteratura. Per quanto riguarda il proligestone, la durata media riportata nella gatta è di circa 6 mesi e mezzo (variabile tra i 3 e i 9 mesi a seconda della stagione riproduttiva) (Romagnoli e Sontas, 2010). Il megestrolo acetato, invece, se somministrato fino a un massimo di 365 giorni consecutivi, offre un effetto contraccettivo a partire dal decimo giorno di terapia e che perdura dagli 80-140 giorni dalla sospensione (Evans e Sutton, 1989).

Il nostro studio sul proligestone ha dimostrato che, seppur con una dose inferiore, la durata dell'effetto medio rimane di 6 mesi e mezzo (193 giorni, 6,4 mesi), con un minimo di 122 giorni (4 mesi) ed un massimo di 244 giorni (8 mesi circa). Nel megestrolo acetato, avendo scelto un periodo di trattamento inferiore a 12 mesi, ci si aspettava un ritorno in calore più rapido dopo la sospensione della terapia, che è avvenuto effettivamente in media dopo circa 36 giorni anziché 80. Solamente la gatta n°9, trattata per 82 giorni tra marzo e giugno, non è ancora tornata in calore. È possibile che all'anestro farmacologico si sia addizionato l'anestro stagionale, e con buone probabilità l'animale ricomincerà a ciclare con l'inizio della nuova stagione riproduttiva (gennaio-febbraio). Si continuerà a monitorare la gatta anche nei prossimi mesi per determinare con precisione l'intervallo trattamento-ritorno in calore. Per quanto riguarda il megestrolo acetato somministrato per os si può dunque affermare che la durata residua della sua efficacia può essere

determinata, oltre che dalla risposta soggettiva dell'animale, dalla durata del trattamento in sé e dal periodo dell'anno in cui il farmaco viene assunto. Tuttavia queste considerazioni sono state fatte basandosi sull'esperienza di soli tre animali, per cui studi su campioni più ampi sarebbero necessari per poterle confermare.

La fertilità post-trattamento non è mai stata indagata se non in alcuni studi condotti sul medrossiprogesterone acetato, in cui si è dimostrato un effetto negativo sul primo calore dopo la terapia progestinica (cuccioli piccoli e deboli, morti premature), ma nessuna alterazione della fertilità a lungo termine (Harris e Wolchuk, 1963); non vi sono riferimenti invece su gatte trattate con proligestone o megestrolo acetato. Nel nostro caso non sono stati riscontrati cali di fertilità, e tre gatte su tre coperte tra il primo ed il secondo calore post-trattamento hanno concepito e partorito (due di loro) senza complicazioni dei cuccioli sani e vitali.

Istologia

Dal punto di vista istologico, vi è testimonianza di ricerche condotte sulle possibili modificazioni microscopiche a livello uterino correlate alla somministrazione di progestinici. In un recente studio si è voluto confrontare l'aspetto istologico dell'apparato riproduttore di un gruppo di gatte sane e che non avevano subito alcun trattamento farmacologico, con quello di gatte trattate con 50 mg IM di medrossiprogesterone acetato da una alle otto volte ad intervalli di 3-5 mesi. Mentre nelle gatte sane l'epitelio endometriale si presentava cuboidale semplice mono o pluristratificato (a seconda che si trovassero in fase di anestro o estro), e lo strato ghiandolare più o meno ramificato ed allungato, in quelle trattate con MPA entrambi gli epiteli luminale e ghiandolare apparivano iperplastici ed ipertrofici, e le ghiandole caratterizzate da una marcata dilatazione, proliferazione e secrezione. Quattro gatte su nove presentavano anche multiple formazioni cistiche (Chatdarong et al., 2005). È stato segnalato anche un raro caso di adenomiosi uterina in una gatta di 12 anni di età trattata per periodi prolungati (dose sconosciuta) con megestrolo acetato (Bulman-Fleming, 2008).

Nel nostro studio una delle sette gatte trattate con proligestone ha sviluppato iperplasia endometriale cistica e piometra. L'aspetto istologico del suo utero rispecchiava il quadro classico di proliferazione e secrezione ghiandolare descritto in precedenza; le formazioni cistiche non interessavano lo strato muscolare, per cui è stata esclusa la presenza di adenomiosi. Le restanti gatte, al contrario, all'esame istologico non hanno mostrato alcun segno di iperplasia né dell'epitelio luminale né ghiandolare. L'alto grado di ramificazione e

proliferazione delle ghiandole endometriali (rimanendo nei limiti fisiologici), accompagnate dalla presenza di diversi follicoli ovarici a diversi stadi di maturazione, hanno confermato la ripresa dell'attività riproduttiva e quindi la fine dell'effetto contraccettivo del farmaco. Solo nel soggetto n°6 il parenchima ovarico è stato giudicato atrofico, e le ghiandole uterine apparivano limitatamente ramificate ed in numero esiguo, per cui è probabile che il proprietario abbia mal interpretato il comportamento dell'animale e che la gatta fosse in realtà ancora in una fase di anestro farmacologico.

Gatta n°7

Si è deciso infine di trattare separatamente l'unico soggetto (n°7) la cui salute è stata compromessa in maniera importante con buona probabilità a causa del trattamento, e in cui si siano effettivamente verificati due dei possibili effetti collaterali (iperplasia endometriale cistica e piometra) imputabili all'uso di farmaci progestinici. La gatta in questione ha assunto una dose di 20 mg/kg di proligestone, iniettato SC, e rivisitata dopo circa un mese con anamnesi di perdite vulvari verdastre. La diagnosi di piometra è stata confermata dall'esame colpocitologico, ecografico ed istologico.

Alla luce dei risultati ottenuti, si è convenuti che questo si tratti di un esempio di paziente "non idoneo" per una terapia progestinica per il controllo del ciclo riproduttivo. La gatta infatti partiva già con un livello di progesterone moderatamente elevato (1,3 ng/ml); non è stato possibile stabilire con certezza se la gatta avesse ovulato 24-48 ore prima e la concentrazione di P4 fosse in ascesa; se così fosse stato, la dose di progestinico somministrata sarebbe andata ad aggiungersi a quella del progesterone endogeno, amplificandone gli effetti. Purtroppo, non essendo riusciti ad eseguire un secondo prelievo del sangue, non conosciamo la concentrazione finale di P4 al momento della diagnosi di piometra.

In secondo luogo, il preparato colpocitologico della gatta presentava una buona percentuale di neutrofili (34%) già alla prima visita, reperto non comune nella citologia vaginale della gatta, nemmeno in fase di diestro (come avviene invece nella cagna); si trattava dunque di un indicatore di una condizione di partenza dell'apparato riproduttore non propriamente ottimale. Il proligestone, mimando l'effetto fisiologico del progesterone, può aver contribuito alla chiusura della cervice, all'atonìa uterina e alla secrezione ghiandolare endometriale, tutte condizioni che possono aver creato un ambiente favorevole allo sviluppo di un'infezione subclinica preesistente, sebbene l'animale apparisse clinicamente sano.

Perciò si ritiene che, pur avendo utilizzato una dose minima e un'unica somministrazione, il farmaco si sia in questo caso rivelato controindicato e pericoloso per il benessere dell'animale.

5. CONCLUSIONE

L'utilizzo di proligestone (Covinan®, Merck), in un'unica iniezione SC di 20 mg/kg, e di megestrolo acetato (Estropill®, Merck), alla dose di 0,010-0,012 mg/kg/die per os per 6-10 settimane, si è rivelato un metodo efficace e relativamente sicuro ai fini del controllo del ciclo riproduttivo nella gatta. Entrambi i farmaci hanno comportato una soppressione reversibile dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (apparentemente più completa e costante per il megestrolo acetato), inibendo con successo lo sviluppo follicolare e l'ovulazione, e di conseguenza anche le manifestazioni estrali ad essi collegate. Sebbene utilizzati a dosi inferiori o per periodi più limitati rispetto a quelli raccomandati, entrambi i prodotti hanno esplicato l'effetto desiderato. Il composto a base di proligestone ha mostrato una durata d'azione identica a quella ottenibile con un protocollo terapeutico a piena dose (6 mesi e mezzo $\pm$ 2 mesi), mentre per il megestrolo acetato la minor durata della terapia ha avuto come conseguenza una riduzione della durata dell'effetto contraccettivo residuo dopo sospensione della somministrazione (in media 36 giorni anziché 80). Nessuno dei due farmaci ha mostrato ripercussioni sulla fertilità post-trattamento.

I trattamenti non hanno comportato grosse modificazioni a livello della salute generale delle gatte testate, che si sono mantenute in ottime condizioni cliniche durante tutto l'arco dello studio, ad eccezione dell'unico caso suddetto di piometra (soggetto n°7) che ha sviluppato la patologia un mese dopo la somministrazione di proligestone. È stato riscontrato un caso di decolorazione del pelo in corrispondenza del punto di inoculo del farmaco, rinvenuto a 9 mesi dalla somministrazione. Finora non era ancora stata riportata in letteratura una tale evenienza tra gli effetti collaterali dell'uso di proligestone iniettabile; sarebbe interessante approfondire con ulteriori studi se essa sia conseguenza del sito di inoculo scelto (regione della coscia piuttosto che interscapolare) o se dipenda principalmente dalla sensibilità soggettiva dell'animale. A livello mammario non si sono

mai riscontrate anomalie di alcun genere se si eccettua il lieve aumento del parenchima mammario rilevato nel soggetto n°10 a 4 mesi dalla somministrazione di megestrolo acetato, e risoltosi spontaneamente dopo sterilizzazione. Per tale effetto non è stato possibile approfondire le indagini, per cui sussiste la possibilità che esso sia stato causato dall'azione del farmaco, anche se non si può escludere che si tratti di un semplice incremento del deposito adiposo o di modificazioni fisiologiche caratteristiche della fase estrale in cui si trovava la gatta.

Contrariamente a quanto riportato in letteratura, in questo studio non è stato riscontrato un aumento significativo del peso negli animali sperimentali. Occorre svolgere ulteriori studi in cui sia possibile monitorare la crescita dell'animale per un lasso di tempo maggiore, possibilmente testare una popolazione più ampia e soprattutto avere un gruppo di controllo di animali non sottoposti ad alcun trattamento farmacologico, per poter affermare con maggior certezza l'esistenza o meno di una relazione tra l'aumento di peso e l'assunzione del progestinico.

Inoltre, nemmeno dal punto di vista comportamentale si è verificato un significativo aumento dell'appetito e dell'assunzione di cibo, né un calo del vagabondaggio o una tendenza alla sedentarietà. Gli unici comportamenti che di fatto hanno visto un calo netto e definitivo sono stati quelli legati alla sfera sessuale (atteggiamenti tipici del calore, vocalizzazioni e marcatura del territorio sono scomparsi in tutte le gatte), a testimonianza dello stato di anestro indotto dal trattamento. Non è possibile stabilire, con un gruppo di sperimentazione così limitato, se l'aumento dell'aggressività del soggetto n°4 sia dovuto al caso o se possa in qualche modo essere riconducibile al trattamento subito.

Per quanto riguarda i parametri ematobiochimici, non sono state rilevate né iperglicemia né iperlipidemia (le uniche due anomalie riconducibili all'uso di progestinici riportate in letteratura), e la maggior parte dei valori ematici non ha mai subito modificazioni preoccupanti per la salute dell'animale. Dei quattro parametri variati in maniera statisticamente significativa, il colesterolo (più alto nel gruppo del megestrolo acetato) e le proteine totali (più alte nel gruppo del proligestone) sono state attribuite ad una questione di selezione casuale degli animali sperimentali, in quanto si presentavano più elevati già dalla prima visita e quindi non potevano ancora aver subito una qualunque influenza da parte del farmaco. L'albumina invece è diminuita nel tempo solo nel gruppo testato con proligestone: si è formulata l'ipotesi che questo dipenda dall'affinità del farmaco per tale proteina plasmatica di trasporto, e che questa condizione possa diminuirne la quota libera

ematica nel tempo. Il megestrolo acetato, per contro, sembra prediligere altre classi di proteine (le globuline). Studi futuri potrebbero indagare con più precisione i meccanismi di trasporto dei due farmaci, la reale influenza sui livelli ematici delle varie tipologie di proteine plasmatiche e l'eventuale ripercussione sulla salute generale dell'animale. Non è ancora chiara invece la relazione tra il megestrolo acetato ed il calo della creatinina: è possibile che una riduzione dell'attività muscolare ed un aumento della sedentarietà dell'animale possano diminuirne la produzione, ma sono necessari ulteriori studi per confermare questa ipotesi.

La fase di anestro indotta dal trattamento è stata confermata e monitorata attraverso il dosaggio ormonale e la colpocitologia. Mentre in tutte le gatte la progesteronemia non ha mai superato il valore di 1,0 ng/ml (escludendo quindi l'evenienza di un'ovulazione), il calo decisivo di estradiolo si è manifestato solo nelle gatte trattate con megestrolo acetato. È possibile che la dose ridotta di proligestone non abbia provocato un grado di soppressione ipotalamica tale da inibire completamente la funzionalità ovarica, ma sia stata tuttavia sufficiente per prevenire il picco di FSH e LH ed evitare lo sviluppo follicolare finale e l'ovulazione.

Anche la citologia vaginale ha permesso di confermare lo stato di quiescenza riproduttiva grazie al progressivo aumento della percentuale media di cellule cheratinizzate e la speculare diminuzione di quelle corneificate, ad eccezione della gatta n°6 in cui è avvenuto l'effetto contrario nei primi tre mesi dal trattamento, pur mostrando livelli basali di estradiolo (< 20 pg/ml) ed essendo sessualmente inattiva. Non è ancora stata chiarita la mancanza di corrispondenza tra livello di estrogeni e quello di cheratinizzazione dell'epitelio vaginale. L'ipotesi dell'asincronia tra curva estrogenica ematica ed il picco di cheratinizzazione, o l'ipotesi di una componente soggettiva sul grado di sensibilità dell'epitelio vaginale all'azione degli estrogeni non sono ancora state dimostrate. Ulteriori studi, comprendenti dei dosaggi ormonali e delle colpocitologie eseguite ad intervalli più ravvicinati (ad esempio ogni 15 giorni) e su di una popolazione più ampia potrebbero aiutare a delineare più dettagliatamente il quadro citologico ed ormonale e a definire con più precisione il grado di relazione tra i due eventi. Inoltre, affiancando il dosaggio delle gonadotropine (FSH e LH), sarebbe possibile stabilire in maniera più sensibile il livello di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, ed escludere un'eventuale produzione di estrogeni extra-ovarica (ad esempio surrenalica).

Con l'ecografia e l'esame istologico è stato possibile escludere la presenza di modificazioni patologiche a carico dell'utero, o confermarle nel caso del soggetto n°7. Una sola gatta delle dieci studiate ha di fatto manifestato, dopo un mese dalla somministrazione di 20 mg/kg SC di proligestone, due degli effetti collaterali riconducibili al trattamento progestinico riportati in letteratura: iperplasia endometriale cistica e piometra. Si tratta di un esempio di come l'utilizzo di dosi corrette in un paziente non idoneo al trattamento possa portare a serie ripercussioni per la salute dell'animale. La gatta infatti presentava un livello di progesterone (1,3 ng/ml) maggiore al limite prefissato di 1,0 ng/ml, ed una probabile infezione genitale subclinica testimoniata dalla presenza di neutrofili nello striscio vaginale; la somministrazione del farmaco può quindi con buone probabilità aver contribuito a peggiorarne le condizioni cliniche.

Concludendo, sia il proligestone che il megestrolo acetato si sono dimostrati prodotti pratici, efficaci e sicuri per il controllo del ciclo riproduttivo nella gatta, e non si dovrebbe omettere di proporre l'utilizzo come alternativa alla sterilizzazione chirurgica, soprattutto in quei proprietari dimostratisi contrari all'intervento, o desiderosi di sopprimere il comportamento sessuale del proprio animale solo per un periodo di tempo limitato in vista di cucciolate future. L'iniezione di proligestone non è risultata per nulla dolorosa per le gatte trattate, e le gocce di megestrolo acetato si sono rivelate sufficientemente appetibili ed i proprietari non hanno riscontrato grosse difficoltà nel somministrarle alla propria gatta. Inoltre, nei pazienti giudicati idonei al trattamento, non si sono verificati effetti collaterali di entità tale da comprometterne la salute. L'utilizzo di questi prodotti dovrebbe quindi essere incoraggiato dal medico veterinario, purché impiegati con coscienza. Si ritiene perciò di fondamentale importanza lo svolgimento di analisi approfondite (esami del sangue e dosaggio ormonale, ecografia dell'apparato riproduttore, colpocitologia), anziché soffermarsi al mero esame obiettivo generale, prima di sottoporre un paziente ad una qualsiasi terapia con farmaci progestinici.

Studi futuri potrebbero indagare la possibilità di utilizzare dosi addirittura inferiori a quelle testate in questo lavoro, aumentando così la sicurezza nell'uso di questi farmaci e riducendo ulteriormente i possibili rischi per il benessere animale.

6. ALLEGATI

Allegato n°1: Questionario Etologico

Data e ora _____ Nome cliente _____ Nome Paziente _____

Razza _____ Età _____

1. Come definirebbe il suo gatto:

- ☐ aggressivo
- ☐ distruttivo
- ☐ depresso
- ☐ ansioso
- ☐ iperattivo
- ☐ giocherellone
- ☐ sedentario

2. Comportamento alimentare

Mangia tutto il cibo disponibile immediatamente o fa piccoli pasti?

- ☐ Tutto il cibo
- ☐ Piccoli pasti

Peso del gatto: _____ kg

Cosa mangia:

- ☐ Crocchette
- ☐ Umido
- ☐ Casalingo
- ☐ Misto
- ☐ Altro (snack, biscottini ecc..)

Marca prodotti: _____

3. Comportamento eliminatorio

Dove urina/defeca normalmente?

- ☐ cassetta igienica
- ☐ fuori casa
- ☐ entrambe

Con quale frequenza urina giornalmente? (indicare un valore da 1 a 3: 1=1 volta; 2= 2 o 3 volte, 3=> 3 volte)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

Con quale frequenza defeca giornalmente?

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ Non so

Tipologia urine:

- ☐ normale
- ☐ rosata
- ☐ rosso vivo
- ☐ rosso mattone

Tipologia feci:

- ☐ normali
- ☐ molli
- ☐ liquide
- ☐ presenza di sangue
- ☐ presenza di parassiti

4. Comportamento di marcatura

Emette vocalizzazioni?

- ☐ Si
- ☐ No

Di che tipo? (descrivere il tipo di suono e il momento in cui lo emette, per es. se concomitante alla marcatura) _____

Con quale frequenza giornaliera ? (indicare un valore da 1 a 3: 1=1 volta; 2= 2 o 3 volte, 3=> 3 volte)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

Emette graffiature?

- ☐ Si
- ☐ No

Su quale substrato? _____

Con quale frequenza giornaliera? (indicare un valore da 1 a 3: 1=1 o 2 volte; 2= 3-5 volte, 3=> 5 volte)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

Effettua marcature facciali?

- ☐ Si
- ☐ No

Su quale substrato? _____

Con quale frequenza giornaliera? (indicare un valore da 1 a 3: 1=1 o 2 volte; 2= 3-5 volte, 3=> 5 volte)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

5. Comportamento sessuale

Mostra atteggiamenti tipici del calore (vocalizzazioni, si strofina, rotolamenti, mostra la zona perineale, spostamento laterale della coda, treno posteriore alzato, lordosi, immobilità)?

- ☐ si
- ☐ no

Se si:

Con quale frequenza? (indicare un valore da 1 a 3: 1= mensilmente, 2= 1 o più volte alla settimana, 3= 1 o più volte al giorno)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ Non so

In quale periodo sono stati rilevati i calori? _____

Quanto sono durati? _____

Si è mai accoppiata?

- ☐ Si
- ☐ No
- ☐ Non so

Se si: data _____

Numero accoppiamenti avvenuti:

- ☐ 1
- ☐ Più di uno

Ha mai partorito?

- ☐ Sì
- ☐ No
- ☐ Non so

Numero di parti: _____

Numero di cuccioli: _____

Problemi al parto: _____

6. Comportamento di esplorazione e gioco

Ha accesso fuori dalla casa?

- ☐ Sì
- ☐ No

Se sì:

Quante ore al giorno passa fuori? _____

Quanto si allontana da casa? (indicare un valore da 1 a 3: 1= sempre vicino, giardino o davanti casa; 2= nei dintorni di casa; 3= si allontana molto da casa)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

Difende il territorio da altri gatti (per es. Torna con segni di lotta con altri gatti)?

- ☐ Sì
- ☐ No

Se sì, con quale frequenza? (indicare un valore da 1 a 3: 1= mensilmente; 2= settimanalmente, 3=giornalmente)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

Gioca?

- ☐ Sì
- ☐ No

Se si:

Con chi/cosa?

- ☐ con oggetti
- ☐ con altri animali
- ☐ con il proprietario

Con quale frequenza? (indicare un valore da 1 a 3: 1= meno di una volta a settimana, 2=1 o più volte a settimana; 3= 1 o più volte al giorno)

- ☐ 1
- ☐ 2
- ☐ 3
- ☐ non so

Caccia, porta prede?

- ☐ Sì
- ☐ No

Tipologia di preda: _____

7. Sonno

È attivo di notte?

- ☐ Sì
- ☐ No

Quante ore dorme di giorno? _____

8. Comportamento di aggressione

È mai aggressiva nei confronti di persone o animali?

- ☐ Sì
- ☐ No

Se si:

Verso chi?

- ☐ gatti conosciuti nel proprio territorio
- ☐ gatti conosciuti fuori dal proprio territorio
- ☐ gatti sconosciuti nel proprio territorio
- ☐ gatti sconosciuti fuori dal proprio territorio
- ☐ gatti maschi
- ☐ gatti femmine
- ☐ persone conosciute nel proprio territorio
- ☐ persone conosciute fuori dal proprio territorio

- persone sconosciute nel proprio territorio
- persone sconosciute fuori dal proprio territorio
- altri animali nel proprio territorio
- altri animali fuori dal proprio territorio

Con quale frequenza? (indicare un valore da 1 a 3: 1= meno di una volta a settimana, 2=1 o più volte a settimana; 3= 1 o più volte al giorno)

- 1
- 2
- 3
- non so

Dimostra di avere controllo del morso e degli artigli? (per es. se provoca lesioni nella vittima)

- Sì
- No

9. Altro

Tollera le manipolazioni (coccole, spazzolare...)? (indicare da 1 a 3: 1= gli piacciono, 2= tollera mal volentieri, 3= diventa aggressivo)

- 1
- 2
- 3

Se sono presenti altri gatti in casa, come descriverebbe il comportamento sociale della gatta nei confronti dei conspecifici?:

- socievole
- indifferente
- aggressivo

Ha assunto o sta assumendo farmaci?

- Sì
- No

Se sì, quali e per quale terapia:

Allegato n°2: Analisi statistiche

Con il test ANOVA si è eseguito uno studio sulla variazione delle medie dei vari parametri confrontando classi di distanza (classe 1= 0 giorni, classe 2= 1-90 giorni; classe 3= > 90 giorni) e gruppi di trattamento (a= proligestone; b= megestrolo acetato). Nella tabella sono riportate le medie con i rispettivi errori standard, e i valori di P, significativi se contrassegnati con un asterisco (*) (< 0,05), ottenuti con il test di Tukey che ha permesso di confrontare la differenza delle medie tra i due trattamenti (a vs b), e tra le classi di distanza (1 vs 2 ecc.) sia considerando la totalità degli individui, sia distinguendoli nei due gruppi di trattamento.

- Parametri ematobiochimici:

❖ ALBUMINA:

	Media	SEM
a x classe 1	31,623	1,060
a x classe 2	32,792	1,254
a x classe 3	26,960	0,991
b x classe 1	29,930	1,619
b x classe 2	30,293	1,619
b x classe 3	26,135	1,983

Confro nto a vs b	Diff. med ie	P	Confro nto classe dist.	Clas si	Diff. med ie	P	Confro nto classi vs trattam a	Clas si	Diff. med ie	P	Confro nto classi vs trattam b	Clas si	Diff. med ie	P
	1,67 2	0,1 76		2 vs 3	4,99 5	0,00 9*		2 vs 3	5,83 2	0,00 4*		2 vs 3	4,15 8	0,2 57
				2 vs 1	0,76 6	0,85 1		2 vs 1	1,16 9	0,75 9		2 vs 1	0,36 3	0,9 86
				1 vs 3	4,22 9	0,02 3*		1 vs 3	4,66 3	0,01 1*		1 vs 3	3,79 5	0,3 18

❖ PROTEINE TOTALI

	Media	SEM
a x classe 1	72,577	3,143
a x classe 2	76,206	3,718
a x classe 3	68,949	2,940
b x classe 1	67,087	4,800
b x classe 2	64,507	4,800
b x classe 3	63,000	5,879

Confro nto a vs b	Diff. med ie	P	Confro nto classe dist.	Clas si	Diff. med ie	P	Confro nto classi vs trattam a	Clas si	Diff. med ie	P	Confro nto classi vs trattam b	Clas si	Diff. med ie	P
	7,71 3	0,04 1*		2 vs 3	4,38 2	0,5 97		2 vs 3	7,25 7	0,2 96		2 vs 3	1,50 7	0,9 79
				2 vs 1	0,52 4	0,9 91		2 vs 1	3,62 9	0,7 40		2 vs 1	2,58 0	0,9 24
				1 vs 3	3,85 8	0,6 56		1 vs 3	3,62 8	0,6 81		1 vs 3	4,08 7	0,8 53

❖ CREATININA

	Media	SEM
a x classe 1	1,210	0,067
a x classe 2	1,432	0,079
a x classe 3	1,400	0,059
b x classe 1	1,467	0,102
b x classe 2	1,630	0,102
b x classe 3	1,725	0,125

Confronto b vs a	Diff. med ie	P	Confronto nto classe dist.	Clas si	Diff. med ie	P	Confronto nto classi vs trattam a	Clas si	Diff. med ie	P	Confronto nto classi vs trattam b	Clas si	Diff. med ie	P
	0,26 0	0,00 2*		2 vs 3	0,31 5	0,9 41		2 vs 3	0,03 2	0,9 44		2 vs 3	0,09 5	0,8 29
				2 vs 1	0,19 3	0,1 00		2 vs 1	0,22 2	0,1 05		2 vs 1	0,16 3	0,5 08
				1 vs 3	0,22 4	0,0 59		1 vs 3	0,19 0	0,1 07		1 vs 3	0,25 8	0,2 68

❖ COLESTEROLO

	Media	SEM
a x classe 1	115,571	13,095
a x classe 2	106,400	15,494
a x classe 3	93,625	12,249
b x classe 1	138,000	20,003
b x classe 2	146,667	20,003
b x classe 3	140,000	24,498

Confronto a vs b	Diff. media	P	Confronto classe dist.	Classi	Diff. media	P	Confronto classi vs trattamento a	Classi	Diff. media	P	Confronto classi vs trattamento b	Classi	Diff. media	P
	36,357	0,022*		2 vs 3	9,721	0,862		2 vs 3	12,775	0,796		2 vs 3	6,667	0,976
				2 vs 1	0,252	1,000		2 vs 1	9,171	0,894		2 vs 1	8,667	0,950
				1 vs 3	9,973	8,848		1 vs 3	21,946	0,452		1 vs 3	2,000	0,998

- Percentuale di cellule cheratinizzate nella colpocitologia

	Media	SEM
a x classe 1	6,000	8,966
a x classe 2	21,500	8,966
a x classe 3	20,889	7,320
b x classe 1	90,000	15,529
b x classe 2	0	15,529
b x classe 3	16,000	12,679

Confro nto a vs b	Diff. medi e	P	Confro nto classe dist.	Cla ssi	Diff. medi e	P	Confro nto classi vs trattam a	Cla ssi	Diff. medi e	P	Confro nto classi vs trattam b	Cla ssi	Diff. medi e	P
	19,2 04	0,0 62		2 vs 3	7,69 4	0,78 6		2 vs 3	0,61 1	0,9 99		2 vs 3	16,0 00	0,70 8
				2 vs 1	37,2 50	0,02 0*		2 vs 1	15,5 00	0,4 53		2 vs 1	90,0 0	0,00 1*
				1 vs 3	29,5 56	0,04 6*		1 vs 3	14,8 89	0,4 18		1 vs 3	74,0 00	0,00 4*

7. BIBLIOGRAFIA

- Axné E, Gustavsson T e Ström Holst B (2008) - Estradiol measurement after GnRH-stimulation as a method to diagnose the presence of ovaries in the female domestic cat. *Theriogenology* 70: 186-191.
- Baldwin CJ, Peter AT, Bosu WTK e Dubielzig RR (1994) - The contraceptive effects of levonorgestrel in the domestic cat. *Laboratory Animal Science* 44: 261-269.
- Bellenger CR e Chen JC (1990) - Effect of megestrol acetate on the endometrium of the prepubertally ovariectomised kitten. *Research in Veterinary Science* 48(1): 112-118.
- Bernstein P (2005) - The human-cat relationship. In: *The Welfare of Cats*, ed. I. Rochlitz, Dordrecht: Springer, pp. 47-89.
- Briggs MH e Briggs M (1973) - Glucocorticoid properties of progestagens. *Steroids* 22(4): 555-559.
- Bulman-Flemin J (2008) - A rare case of uterine adenomyosis in a Siamese cat. *The Canadian Veterinary Journal* 49(7): 709-712.
- Burke TJ (1982) - Pharmacologic control of oestrus in the bitch and queen. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 12: 79-84.
- Chastain CB, Graham CL e Nichols CE (1981) - Adrenocortical suppression in cats given megestrol acetate. *American Journal of Veterinary Research* 42(12): 2029-2035.
- Chatdarong K, Rungsipipat A, Axné E e Forsberg CL (2005) - Hysterographic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. *Theriogenology* 64: 12-29.
- Chen JC e Bellenger CR (1987) - Obese appearance, mammary development and retardation of hair growth following megestrol acetate administration to cats. *Journal of Small Animal Practice* 28: 1161-1167.
- Church DB, Watson AD e Emslie DR (1994) - Effects of proligestone and megestrol on plasma adrenocorticotrophic hormone, insulin and insulin-like growth factor-1 concentrations in cats. *Research in Veterinary Science* 56: 175-178.
- Colton MW (1965) - Progestational agents in pet practice, indications, agents and doses, precautions. *Modern Veterinary Practice* June 1965: 53-56.

- Edqvist LE e Stabenfeldt GH (1989) - Clinical reproductive endocrinology. In: Clinical Biochemistry of Domestic Animals, ed. J.J. Kaneko, San Diego: Academic Press Inc., pp. 650-677.
- England GCW (2010) - Physiology and endocrinology of the female. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, ed. G. England e A. von Heimendahl, Cambridge: British Small Animal Veterinary Association, pp. 1-13.
- Evans JM e Sutton DJ (1989) - The use of hormones, especially progestagens, to control oestrus in the bitch. *Journal of Reproduction and Fertility* 39: 163-173.
- Faver CA (2009) - Sterilization of companion animals: exploring the attitudes and behaviors of Latino students in south Texas. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 12 (4): 314-330.
- Feldman EC e Nelson RW (1996) - Riproduzione del gatto. In: Endocrinologia e Riproduzione del Cane e del Gatto, ed. G. Aria, Torino: Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET), pp. 829-860.
- Findik M, Erunal Maral N e Aslan S (1999) - The use of proligestone, megestrol acetate and GnRH on queens with the aim of hormonal contraception. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 23: 455-460.
- Ghaffari MS (2008) - Iatrogenic hyperlipidemia associated with lipid-laden aqueous humor in a cat following administration of megestrol acetate. *Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences* 32(5): 399-401.
- Gimenez F, Stornelli MC, Tittarelli CM, Savignone CA, Dorna IV, de la Sota RL e Stornelli MA (2009) - Suppression of estrus in cats with melatonin implants. *Theriogenology* 72: 493–499.
- Goericke-Pesch S, Wehrend A e Georgiev P (2014) - Suppression of fertility in adult cats. *Reproduction in Domestic Animals* 49: 33-40.
- Goodrowe KL, Howard JG, Schmidt PM e Wildt DE (1989) - Reproductive biology of the domestic cat with special reference to endocrinology, sperm function and in-vitro fertilization. In: Dog and Cat Reproduction, Contraception and Artificial Insemination, ed. P.W. Concannon, D.B. Morton e B.J. Weir, Cambridge: Journals of Reproduction and Fertility Ltd. (JRF), pp. 73-90.
- Greenberg M, Lawler D, Zawistowski S e Jöchle W (2013) - Low-dose megestrol acetate revisited: a viable adjunct to surgical sterilization in free roaming cats? *Veterinary Journal* 196(3): 304-308.

- Harris TW e Wolchuk N (1963) - The suppression of oestrus in the dog and cat with long term administration of synthetic progestational steroids. *American Journal of Veterinary Research* 24: 1003-1006.
- Hayden DW, Barnes DM e Johnson KH (1989) - Morphologic changes in the mammary gland of megestrol acetate-treated and untreated cats: a retrospective study. *Veterinary Pathology* 26: 104-113.
- Henik RA, Olson PN e Rosychuck RA (1987) - Progestagen therapy in cats. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarians* 7: 132-141.
- Hernandez FJ, Chertack M e Gage PA (1975) - Feline mammary carcinoma and progestagens. *Feline Practice* 5: 45-48.
- Hinton M e Gaskell CJ (1977) - Non-neoplastic mammary hypertrophy in the cat associated either with pregnancy or with oral progestagen therapy. *The Veterinary Record* 100: 277-280.
- Johnston S e Rhodes L (2015) - No surgery required: the future of feline sterilization. An overview of the Michelson Prize & Grants in reproductive biology. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 17: 777-782.
- Kutzler M e Wood A (2006) - Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* 66: 514-525.
- Kwochka KW e Short BG (1984) - Cutaneous xanthomatosis and diabetes mellitus following long-term therapy with megestrol acetate in a cat. *Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian* 6: 185-192.
- Leyva H, Madley T e Stabenfeldt GH (1989) - Effect of light manipulation on ovarian activity and melatonin and prolactin secretion in the domestic cat. *Journal of Reproduction and Fertility* 39: 125-133.
- MacDougall LD (2003) - Mammary fibroadenomatous hyperplasia in a young cat attributed to treatment with megestrol acetate. *The Canadian Veterinary Journal* 44: 227-229.
- Mattoon JS e Nyland TG (1995) - Ovaries and uterus. In: *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, St Louis: Elsevier Saunders, pp. 634-654.
- Michel C (1993) - Induction of oestrus in cats by photoperiodic manipulation and social stimuli. *Laboratory Animals* 27(3): 278-280.
- Middleton DJ, Watson AD, Howe CJ e Caterson ID (1987) - Suppression of cortisol responses to exogenous adrenocorticotrophic hormone, and the occurrence of side

- effects attributable to glucocorticoid excess, in cats during therapy with megestrol acetate and prednisolone. *Canadian Journal of Veterinary Research* 51(1): 60-65.
- Munson L (2006) - Contraception in felids. *Theriogenology* 66: 126-134.
 - Natoli E, Maragliano L, Cariola G, Faini A, Bonanni R, Cafazzo S, Fantini C (2006) - Management of feral domestic cats in the urban environment of Rome (Italy). *Preventive Veterinary Medicine* 77: 180-185.
 - Nelson M (1977) - After-effect of injection. *Veterinary Record* 100: 78.
 - New JC, Kelch WJ, Hutchison JM, Salman MD, King M, Scarlett JM e Kass PH (2004) - Birth and death rate estimates of cats and dogs in US households and related factors. *Journal of Applied Animal Welfare Science* 7: 229-284.
 - O'Brien CR e Wilkie JS (2001) - Calcinosis circumscripta following an injection of proligestone in a Burmese cat. *Australian Veterinary Journal* 79: 187-189.
 - Oen EO (1977) - The oral administration of megestrol acetate to postpone oestrus in cats. *Nordisk Veterinær Medicin* 29(6): 287-291.
 - Okkens AC, Kooistra HS e Nickel RF (1997) - Comparison of long-term effects of ovariectomy versus ovariohysterectomy in bitches. *Journal of Reproduction and Fertility* 51: 227-231.
 - Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Sherer D e Sorenmo KU (2005) - Association between ovariohysterectomy and feline mammary carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 560–563.
 - Peterson ME (1987) - Effects of megestrol acetate on glucose tolerance and growth hormone secretion in the cat. *Research in Veterinary Science* 42(3): 354-357.
 - Prescott CW (1973) - Reproduction patterns in the domestic cat. *Australian Veterinary Journal* 49: 126-129.
 - Pukay BP (1979) - A hyperglycemia-glucosuria syndrome in cats following megestrol acetate therapy. *The Canadian Veterinary Journal* 20:117.
 - Purkay BP e Stevenson DA (1983) - Mammary hypertrophy in an ovariohysterectomized cat. *The Canadian Veterinary Journal* 24: 143-144.
 - Robertson SA (2008) - A review of feral cat control. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10(4): 366-75.
 - Romagnoli S (2015) - Progestins to control feline reproduction: historical abuse of high doses and potentially safe use of low doses. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 17: 743-752.

- Romagnoli S e Sontas H (2010) - Prevention of breeding in the female. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, ed. G. England e A. von Heimendahl, Cambridge: British Small Animal Veterinary Association, pp. 23-33.
- Root MV, Johnston SD e Olson PN (1995) - Oestrus length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat. *Journal of American Animal Hospital Association* 31(5): 429-33.
- Schindler AE, Campagnoli C, Druckmann R, Huber J, Pasqualini JR, Schweppe KW e Thijssen JHH (2008) - Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas* 61(1): 171-180.
- Schneider R, Dorn CR e Taylor DON (1969) - Factors influencing canine mammary cancer development and postsurgical survival. *Journal of the National Cancer Institute* 43: 1249–1261.
- Senger PL (2003) - Puberty. In: Pathway to Pregnancy and Parturition, Washington: Current Conceptions Inc., pp. 128-144.
- Senger PL (2003) - Regulation of reproduction. In: Pathway to Pregnancy and Parturition, Washington: Current Conceptions Inc., pp 102-127.
- Senger PL (2003) - Reproductive cyclicity: the follicular phase. In: Pathway to Pregnancy and Parturition, Washington: Current Conceptions Inc., pp. 164-188.
- Shille VM e Sojka NJ (1995) - Feline reproduction. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine, ed. S.J. Ettinger e E.C. Feldman, Philadelphia: WB Saunders Co, pp. 1690-1698.
- Sjaastad OV, Sand I e Hove K (2010) - Reproduction. In: Physiology of Domestic Animals, Oslo: Scandinavian Veterinary Press, pp. 683-734.
- Sontasa BH, Kaysigiz F e Ekici H (2012) - Methods of oestrus prevention in dogs and cats: a survey of Turkish veterinarians' practices and beliefs. *Archivos de Medicina Veterinaria* 44: 155-166.
- Sparkes AH, Cope K, Ellis SLH, Finka L, Halls V, Hiestand K, Horsford K, Laurence C, MacFarlane I, Neville PF, Stavisky J e Yeates J (2013) - ISFM guidelines on population management and welfare of unowned domestic cats (*Felis catus*). *Journal of Feline Medicine and Surgery* 15: 811-817.
- Tomlinson MJ, Barteaux L, Ferns LE e Angelopoulos E (1984) - Feline mammary carcinoma: a retrospective evaluation of 17 cases. *The Canadian Veterinary Journal* 25: 435-439.

- Tsutsui T, Higuchi C, Soeta M, Oba H, Mizutani T e Hori T (2009) - Plasma LH, ovulation and conception rates in cats mated once or three times on different days of oestrus. *Reproduction in Domestic Animals* 44(2): 76-78.
- Vickery BH, McRae GI, Goodpasture JC e Sanders LM (1989) - Use of potent LHRH analogues for chronic contraception and pregnancy termination in dogs. *Journal of Reproduction and Fertility* 39: 175-187.
- Vitasek R e Dendisova H (2006) - Treatment of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of proligestone. *Acta Veterinaria Brno* 75: 295-297.
- Von Heimendahl A e England GCW (2010) - Determining breeding status. In: BSAVA Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology, Cambridge: British Small Animal Veterinary Association, pp. 44-50.
- Watson AD, Church DB, Emslie DR e Middleton DJ (1989) - Comparative effects of proligestone and megestrol acetate on basal plasma glucose concentrations and cortisol responses to exogenous adrenocorticotrophic hormone in cats. *Research in Veterinary Science* 47(3): 374-376.
- Welsh CP, Gruffydd-Jones TJ e Murray JK (2014) - Poor owner knowledge of feline reproduction contributes to the high proportion of accidental litters born to UK pet cats. *Veterinary Record* 174(5): 118.
- Woodland M, Pack LA, Rist P e Crane B (2014) - Comparison of digital radiography, ultrasonography, and positive contrast vaginourethrography for determining reproductive status of female cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 55(4): 368-373.

8. RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano:

il professor Romagnoli, per avermi offerto la possibilità di svolgere uno studio così interessante ed innovativo;

la dottoressa Milani, per avermi indirizzato nel mio lavoro;

il dottor Stelletta, per avermi aiutato nell'analisi statistica;

il laboratorio di anatomia patologica ed in particolare la dottoressa Silvia Ferro per essersi occupati dell'esame istologico ed avermi permesso di produrre la documentazione fotografica dei preparati citologici ed istologici;

tutto il personale tecnico di laboratorio e medico veterinario dell'OVUD (in particolar modo gli ecografisti, anestesisti e chirurghi ostetrici) per avermi pazientemente sopportato, consolato ed aiutato nella raccolta dati;

genitori, parenti ed amici, che non hanno mai smesso di incoraggiarmi e credere in me;

tutti i proprietari e le loro gatte che hanno tanto gentilmente contribuito alla stesura di questa tesi.