



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in

MEDICINA VETERINARIA

Effetti di impianti di deslorelin acetato su asine coinvolte in IAA

Relatore:
Prof.ssa Maria Elena Falomo

Laureanda:
Federica Bortolazzi
Matricola n°:
1084082

ANNO ACCADEMICO 2016-2017

*A Miluna, compagna silenziosa di lunghe
giornate di studio*

INDICE

1. RIASSUNTO	7
2. INTRODUZIONE.....	9
2.1 Premessa.....	10
2.2 Ciclo riproduttivo delle asine	11
2.3 Comportamento estrale: caratteristiche etologiche della specie	16
2.4 Effetti della sfera riproduttiva sulle attività: problemi comportamentali, rischi per gli utenti	19
2.5 Metodi di contraccezione degli equidi. Effetti sulla ciclicità e sul comportamento	20
2.5.1 Progestinici ed estrogeni	21
2.5.2 Immunocontraccezione	23
2.5.3 Agonisti e antagonisti del GnRH	28
2.5.4 Altre metodiche	30
2.6 Il deslorelin acetato a lento rilascio	32
2.6.1 Effetti nella cavalla.....	33
2.6.2 Effetti in altri mammiferi	36
2.7 Obiettivi dello studio.....	39
3. MATERIALI E METODI	41
3.1 Struttura e animali	41
3.2 Impianto.....	44
3.3 Monitoraggio riproduttivo	45
3.3.1 Ecografie	45
3.3.2 Dosaggi ormonali	46

3.4 Studio etologico	48
3.4.1 Monitoraggio del comportamento estrale	49
3.4.2 Osservazioni sociali	51
3.4.3 Osservazioni di situazioni di interazione.....	57
3.4.4 Questionari per gli operatori	61
3.5 Analisi dei risultati.....	63
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	65
4.1 Inibizione dell'estro.....	65
4.1.1 Manifestazioni estrali.....	65
4.1.2 Reperti ecografici	67
4.1.3 Dosaggi ormonali	68
4.1.4 Riassunto e discussione degli esiti del monitoraggio riproduttivo.....	75
4.2 Comportamento sociale	82
4.2.1 Osservazioni sociali	82
4.2.2 Interazioni con le persone	86
4.2.3 Questionari	89
5. CONCLUSIONE	91
6. ALLEGATI.....	93
7. BIBLIOGRAFIA	97
8. RINGRAZIAMENTI	103

1. RIASSUNTO

Secondo le linee guida nazionali per lo svolgimento degli interventi assistiti con gli animali (IAA) non possono essere impiegate femmine in fase estrale. Da questo nasce l'esigenza di un controllo del ciclo estrale degli animali adibiti a questo scopo. Questo studio si propone di testare l'efficacia di impianti di deslorelin acetato a lento rilascio, un agonista del GnRH, in asine impiegate in queste attività per l'inibizione del ciclo estrale e dei comportamenti estrali ad esso correlati, verificando allo stesso tempo se tali impianti causino variazioni nel comportamento verso i conspecifici e nell'interazione con le persone. L'uso di impianti di questo tipo nell'asina non ha precedenti in letteratura. È stato condotto uno studio sperimentale su 8 asine che hanno ricevuto 2 impianti sottocutanei di Suprelorin® da 4.7 mg ciascuna, dopo sincronizzazione del ciclo estrale mediante doppia somministrazione di PGF2 α . In seguito all'impianto le asine sono state monitorate per 40 giorni tramite ecografie transrettali, prelievi di sangue per il dosaggio di progesterone, estrogeni e DHEA, e rilevazione dei comportamenti estrali. In parallelo è stato condotto uno studio etologico che si compone di 8 osservazioni sociali dell'intero gruppo di asini nel quale vivono le 8 asine oggetto del test, di cui 4 pre e 4 post impianto, e di 6 giornate, 3 pre e 3 post impianto, in cui sono stati realizzati 2 video di situazioni in cui le asine avevano la possibilità di interagire con un uomo e con una donna a loro sconosciuti. Per tutta la durata del monitoraggio riproduttivo non è mai stato riscontrato un quadro clinico compatibile con uno stato estrale in nessuna delle asine, rilevando assenza di edema endometriale, estrogeni bassi e follicoli di diametro non superiore ai 25 mm. Il progesterone ha mostrato un andamento estremamente variabile ed individuale, mentre il dosaggio del DHEA non ha permesso di individuare nessuna particolare influenza dei valori di quest'ormone sull'espressione di comportamenti estrali. L'esito è stato quindi positivo per quanto concerne l'inibizione dell'estro con un'efficacia del 100% per almeno 35 giorni. Al contrario il monitoraggio comportamentale ha messo in evidenza l'espressione di comportamenti estrali nel 50 % delle asine, non garantendo un risultato soddisfacente per l'applicazione su animali impiegati in IAA. Questo lascia supporre che il comportamento estrale possa manifestarsi indipendentemente dal quadro ecografico ed ormonale tipico dell'estro e che abbia quindi un valore sociale per il quale viene espresso anche in altre occasioni. Per quanto concerne il comportamento in generale delle asine, le osservazioni sociali e delle interazioni con le persone hanno rivelato solo poche variazioni nel comportamento delle asine tra il pre e il post impianto, in particolare l'aumento del comportamento di allogrooming nel post impianto. In conclusione avendo ottenuto un'inibizione della ciclicità ma non del comportamento estrale, è probabile che tali comportamenti non possano essere completamente inibiti anche dall'uso di altre metodiche contraccettive in soggetti che vivono in un contesto sociale. Fermo restando la necessità di ulteriori studi in merito, appare utile la revisione delle linee guida che dovrebbero tenere in considerazione le peculiarità riproduttive delle differenti specie animali impiegate in IAA.

2.INTRODUZIONE

Gli interventi assistiti con gli animali sono divenuti nel corso di questi ultimi anni pratica sempre più diffusa, riconosciuta come metodo terapeutico e di conseguenza sempre più regolamentata. In particolare gli asini, con le loro doti di docilità ed empatia, hanno conquistato a pieno diritto il titolo di “animale da pet therapy” portando alla nascita dell’onoterapia, cioè la terapia assistita con gli animali che coinvolge l’asino. Questo animale, storicamente utilizzato dall’uomo per il lavoro, la carne ed il latte, ha così fatto il suo ingresso in un nuovo settore in cui le necessità di management sono completamente diverse.

Nel contempo la richiesta di sviluppo di nuove tecnologie riproduttive è stata sempre più soddisfatta grazie agli studi portati avanti nell’ambito della ricerca scientifica.

In questo lavoro vedremo come alcune problematiche che possono emergere nella gestione degli asini impiegati nell’onoterapia potrebbero trovare delle soluzioni grazie all’uso di tecnologie riproduttive già esistenti ma non ancora pensate per l’applicazione in questo ambito.

2.1 Premessa

La premessa di questo studio si fonda sull'osservazione delle linee guida nazionali stabilite nel Marzo 2015 dal ministero della salute per lo svolgimento di interventi assistiti con gli animali (IAA). Leggendo le suddette linee guida apprendiamo che "gli animali impiegati negli interventi assistiti appartengono a specie domestiche in grado di instaurare relazioni sociali con l'uomo. Le specie maggiormente impiegate sono: cane, cavallo, asino, gatto, coniglio". Questi animali devono naturalmente rispondere ad una serie di caratteristiche e requisiti, sia sanitari che comportamentali, che li rendano idonei alla mansione. In particolare tra le indicazioni fornite dal ministero della salute troviamo questa specifica: "Gli animali coinvolti devono essere adulti e le femmine non possono essere impiegate durante la fase estrale, la lattazione o lo stato di gravidanza avanzata (in conformità con quanto previsto dal Regolamento (CE) n. 1/2005)".

Per ottemperare a tali disposizioni nasce quindi la necessità di un monitoraggio e ancor meglio di un controllo sul ciclo estrale degli animali impegnati quotidianamente in questo genere di attività.

Riportando la nostra attenzione in particolare all'asino, possiamo notare come spesso gli interventi assistiti che coinvolgono questo animale si svolgano in contesti di gruppo o in strutture in cui può essere difficile l'isolamento di ogni animale in fase estrale. Trattandosi di animali gregari abituati a vivere in gruppo e basando le attività sulla libertà degli asini di rimanere nel loro contesto e scegliere liberamente se interagire o meno, diviene difficile evitare le interazioni con eventuali asine in fase estrale. Inoltre sono da considerare anche i casi di centri specializzati in IAA che possiedono solo poche asine, condizione che durante la stagione riproduttiva può facilmente sfociare nella mancanza di animali utilizzabili per gli interventi assistiti, con conseguente danno economico per il centro.

Proprio per queste esigenze risulta quindi ancor più importante la ricerca di un metodo efficace e sicuro per l'inibizione dell'estro negli animali impiegati in questo genere di attività.

2.2 Ciclo riproduttivo delle asine

Se ci interroghiamo sulle caratteristiche fisiologiche dell'asino viene spontaneo fare riferimento al cavallo, equino meglio conosciuto e senz'altro più studiato. Nello specifico pensando alla fisiologia riproduttiva di un equino il primo pensiero è quello di un animale poliestrato stagionale, in particolare di un long-day breeder, cioè di un animale che riprende la sua attività riproduttiva all'aumentare delle ore di luce e quindi con l'arrivo della primavera. Questo si traduce con una certa percentuale di animali interessati da una fase di anestro invernale, preceduta e seguita da una fase di transizione. Il periodo di attività riproduttiva è rappresentato dai mesi primaverili ed estivi, con una transizione primaverile a partire dal mese di Febbraio ed una transizione autunnale dal mese di Settembre. Sembra invece che il ciclo estrale dell'asina sia meno influenzato dalla stagionalità rispetto a quello della cavalla, con una maggior percentuale di asine cicliche durante tutto l'anno (Ginther et al., 1987).

Anche se possiamo parlare di influenze stagionali sulla sua funzionalità riproduttiva, la netta suddivisione dell'anno in una stagione ovulatoria ed una anovulatoria nel caso dell'asina è assente o limitata (Ginther et al., 1987).

Infatti vari studi condotti per indagare le caratteristiche riproduttive dell'asina hanno riportato anestri stagionali spesso brevi e in percentuali di animali anche molto basse: Henry et al. (1987) hanno riportato un tasso di anestro stagionale del 40% in uno studio annuale su 10 asine cicliche. Similmente Ginther et al. (1987) riportano una breve fase di anestro stagionale nel 33% delle 12 asine osservate. In altri casi le percentuali sono ancor più basse, come una fase di anestro solo nel 10% di asine Catalane (Taberner et al., 2008) o nel caso di uno studio su 12 asine Martina Franca rimaste tutte normalmente cicliche per l'intero arco dell'anno (Contri et al., 2014). Per quanto concerne invece le caratteristiche della fase di anestro, abbiamo una lunghezza molto variabile riportata tra i 39 e i 72 giorni in Wisconsin (Ginther et al., 1987), dai 74 ai 263 giorni in Brasile (Henry et al., 1987) e tra i 113 e i 191 giorni in Portogallo (Quaresma et al., 2015).

È possibile altresì individuare delle situazioni intermedie di rottura della normale ciclicità senza tuttavia arrivare ad una totale quiescenza, come ad esempio il verificarsi di estri

ovulatori silenti, della persistenza del corpo luteo o di cicli anovulatori (Kebede et al., 2012; Quaresma et al., 2015). In figura 1 è possibile notare come sia diversa l'incidenza di cicli anovulatori dal mese di Gennaio al mese di Aprile, cioè man mano che aumentano le ore di luce.

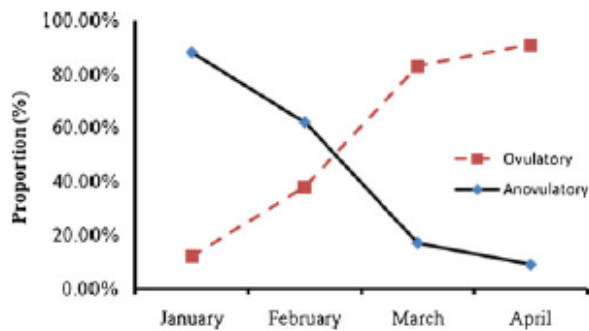


Figura 1. Incidenza di cicli ovulatori e anovulatori durante lo studio. Tratto da Kebede et al., Tropical animal health production (2012) 44:1965-1970

In definitiva possiamo parlare delle asine come degli animali poliestrionali che mostrano un pattern stagionale più pronunciato in alcune circostanze piuttosto che in altre; questa differenza non è del tutto chiara ma potrebbe essere correlata alle differenze climatiche tra i vari siti degli studi (Henry et al., 1998).

È anche possibile che il fotoperiodo influenzi con minor intensità l'asina rispetto alla cavalla a causa della sua evoluzione in aree più vicine all'equatore (Beja-Pereira et al., 2004).

Inoltre è dimostrato che il BCS (Body Condition Score) gioca un ruolo importante nell'attività ovarica durante la stagione non riproduttiva, suggerendo che il grasso corporeo sia un importante modulatore dell'attività riproduttiva durante l'inverno (Quaresma et al., 2015). Pare che la diminuzione del BCS all'avvicinarsi dell'inverno sia correlata all'ingresso in una fase di anestro stagionale, fase che sembra interessare le femmine con uno scarso BCS e che termina nel momento in cui gli animali riguadagnano una buona condizione corporea, mentre le asine in grado di mantenere il loro BCS costantemente sopra una certa soglia pare siano anche quelle che mantengono una ciclicità regolare per tutto l'anno (Quaresma et al., 2015).

Il ciclo estrale dell'asina è caratterizzato dall'alternarsi di fasi di diestro, con presenza di un corpo luteo e livelli elevati di progesterone, a fasi estrali nelle quali in seguito ad un picco di estrogeni avviene l'ovulazione di uno o talvolta più follicoli. La fase estrale

inoltre è caratteristica e facilmente riconoscibile per la presenza di comportamenti estrali tipici della specie.

Anche per quanto riguarda la durata del ciclo estrale troviamo tra asina e cavalla delle similitudini ma anche qualche differenza. Mentre la durata dell'estro è sovrapponibile tra i due animali, l'asina è caratterizzata da una maggior durata della fase di diestro, e conseguentemente da un ciclo estrale più lungo rispetto alla cavalla (Blanchard et al., 1999).

Dagli studi condotti sul ciclo estrale di asine di diverse razze e provenienze (Martina Franca, Mammoth, Asino di Miranda, Catalano), risultano intervalli lievemente diversi ma che possiamo riassumere con un range di lunghezza del ciclo estrale tra i 23 e i 25 giorni, di cui circa 6 giorni di estro e 17-19 giorni di diestro (Blanchard et al., 1999; Taberner et al., 2008; Contri et al., 2014; Quaresma e Payan-Carreira, 2015). Nonostante una buona uniformità dei dati riportati da questi studi, occorre comunque tenere in conto l'esistenza di range anche più ampi riportati in letteratura. Infatti secondo quanto riportato in un lavoro di Pugh del 2002, di solito la lunghezza del ciclo estrale nell'asina si attesta tra i 23 e i 30 giorni ma è riportato un range variabile tra i 20 e i 40 giorni, mentre la durata dell'estro si attesta in genere tra i 6 e i 9 giorni nel corso dei quali si verifica l'ovulazione a circa 5-6 giorni dalla comparsa dell'estro.

Al fine di monitorare il ciclo riproduttivo degli animali è inoltre utile conoscere l'andamento del profilo ormonale e i rilievi ecografici normalmente reperibili.

Il momento dell'ovulazione può essere previsto grazie ad una serie di parametri quali il comportamento estrale, le dimensioni del follicolo e la sua texture (Taberner et al., 2008).

In media il diametro massimo del follicolo riscontrato prima dell'ovulazione è di circa 45 mm in asine Catalane (Taberner et al., 2008) e di 43,7 mm in asine Martina Franca (Contri et al., 2014) ma in altre razze troviamo diametri inferiori, tra i 36 e i 41 mm, differenza che potrebbe essere correlata alle minori dimensioni degli animali (Taberner et al., 2008). Ad esempio in Asine di Miranda sono riportati follicoli pre-ovulatori con un diametro medio di 38.4 mm (Quaresma e Payan-Carreira, 2015). Inoltre è da tenere in considerazione il verificarsi di ovulazione multiple (la cui frequenza è riportata in un range compreso tra il 42 e il 44 %) in quanto in presenza di ovulazioni multiple il

diametro medio follicolare è minore rispetto alle ovulazioni singole (Taberner et al., 2008; Quaresma e Payan-Carreira, 2015).

Infine per il monitoraggio del ciclo estrale occorre conoscere l'andamento di ormoni quali il progesterone e gli estrogeni.

I dosaggi del progesterone ci aiutano a stabilire la fase del ciclo in cui si trova l'animale.

Infatti in seguito all'ovulazione la formazione del corpo luteo, principale produttore del progesterone, fa sì che questo ormone aumenti e resti alto nel sangue durante la fase diestrale. All'avvicinarsi della successiva ovulazione il corpo luteo regredisce portando ad una caduta dei valori nei 2-3 giorni precedenti al ritorno in estro. La concentrazione del progesterone è inferiore o uguale ad 1 ng/ml nei giorni subito prima della comparsa dell'estro e rimane tale fino al giorno seguente all'ovulazione, dopodiché inizia a crescere fino a raggiungere un plateau tra i giorni 4 e 14 post-ovulazione rimanendo a valori superiori ai 2 ng/ml per un periodo di circa 16 giorni (Henry et al., 1987). I valori massimi di progesterone raggiunti durante il diestro sono influenzati dal numero delle ovulazioni e possono variare dai 15 ai 51 ng/ml (Henry et al., 1987). La concentrazione degli estrogeni invece inizia a crescere non appena il progesterone diminuisce raggiungendo il suo picco da 1 a 3 giorni prima dell'ovulazione, per poi tornare a livelli diestrali circa 3 giorni dopo l'ovulazione (Henry et al., 1987).

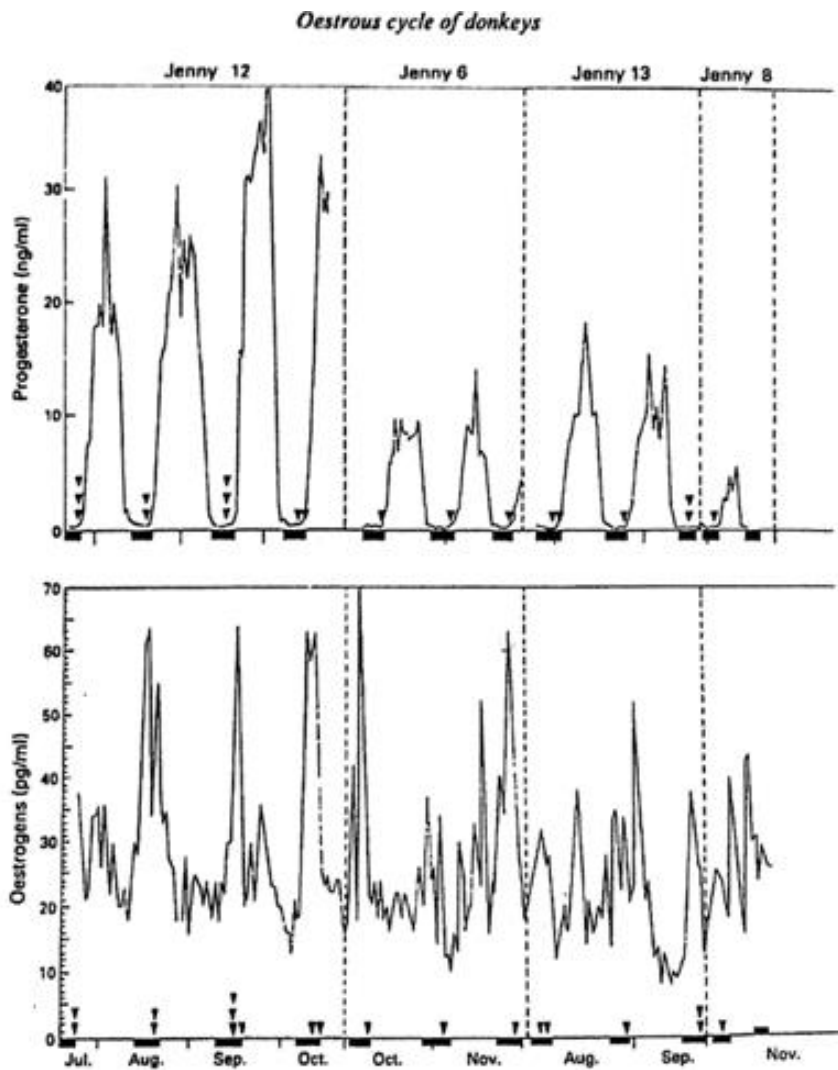


Figura 2. Concentrazioni ematiche di progesterone ed estrogeni in asine non gravide. I periodi di estro sono indicati con dei blocchi e le ovulazioni condelle frecce. Tratto da Henry et al. *J. Reprod. Fert.* (1987) 35:297-303

Dal grafico (fig. 2) possiamo vedere come i valori degli estrogeni al loro picco possano variare dai 30 ai 70 pg/ml.

2.3 Comportamento estrale: caratteristiche etologiche della specie

La fase estrale dell'asina è caratterizzata dalla manifestazione di un repertorio di comportamenti sia omotipici (femminili) che eterotipici (maschili). Per quanto riguarda i comportamenti omotipici quello più frequente e caratteristico della specie è costituito dalla continua apertura e chiusura della bocca con movimenti verticali della mandibola, eseguito con il collo e la testa estesi verso il basso e le orecchie tenute indietro (McDonnell, 1998). Questo rappresenta il principale e primo indicatore dell'estro ma deve essere accompagnato da altri comportamenti quali il lampeggiamento del clitoride, la coda inarcata (fig. 3), l'urinazione frequente, l'accettazione del maschio, l'immobilità alla monta (Vandeplassche et al., 1981).



Figura 3. Postura della coda durante l'estro. Tratto da Moehlman, *Applied Animal Behaviour Science* (1998), 60:125-169.

In tabella 1 troviamo un riassunto dei principali comportamenti da valutare per poter stabilire se l'asina è in estro o meno.

COMPORTAMENTI CHE DENOTANO ESTRO	
<i>"Mouth clapping"</i>	Frequente apertura e chiusura della bocca tramite movimenti verticali della mandibola accompagnati da allungamento e abbassamento della testa e orecchie tenute indietro
<i>"Winking"</i>	Ritmica eversione delle labbra vulvari con esposizione del clitoride
<i>"Raising tail"</i>	Stazione con coda alzata in ogni momento del periodo di stimolazione da parte del maschio
<i>"Urinating"</i>	Passaggio di urina e probabilmente di fluidi del tratto genitale
<i>"Posturing or presenting"</i>	Posizione corporea finalizzata a permettere la copula che include posteriori abdotti, coda inarcata, pelvi inclinata e abbassamento dell'area perineale
COMPORTAMENTI CHE DENOTANO ASSENZA DI ESTRO	
<i>"Tail down"</i>	Coda tenuta bassa tra le gambe
<i>"Not interested"</i>	Nessuna risposta alla presenza dello stallone

Tabella 1. Descrizione dei comportamenti da valutare per accertare l'estro nell'asina basata sullo studio "Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys", Vandeplassche et al. 1981

Inoltre in caso di asine tenute al pascolo è possibile osservare come primo segnale dell'avvicinarsi dell'estro il graduale avvicinamento al maschio; infatti circa un giorno prima dell'inizio di veri e propri comportamenti estrali, le femmine iniziano a stare maggiormente in vicinanza del maschio e il numero degli approcci da parte della femmina aumenta significativamente dall'inizio dell'estro raggiungendo i massimi valori tra 1 e 3 giorni prima dell'ovulazione (Henry et al., 1998).

L'accettazione del maschio non è però sempre scontata anche durante l'estro. Spesso è possibile osservare le asine calciare lo stallone, questo avviene principalmente all'inizio di ogni interazione sessuale e più frequentemente all'inizio e alla fine della fase estrale (Henry et al., 1998)

I comportamenti eterotipici sono invece comportamenti tipicamente attribuiti al sesso maschile che vengono manifestati da una femmina durante la fase estrale. Quando più

asine sono in estro nello stesso territorio tendono a formare dei gruppi sessualmente attivi che ricordano l'attività sessuale delle femmine bovine e all'interno di questi gruppi oltre ai comportamenti omotipici esibiscono anche una serie di comportamenti eterotipici quali il flehmen (fig.4), montare, radunarsi, rincorrersi, annusarsi, mordersi, coprire urine o feci con le proprie (Mc Donnell, 1998). Per avere un'idea della frequenza di quanto riportato è interessante osservare come in uno studio condotto su gruppi di asine tenute al pascolo l'88% di loro ha mostrato almeno una volta comportamenti eterotipici (Henry et al., 1998).

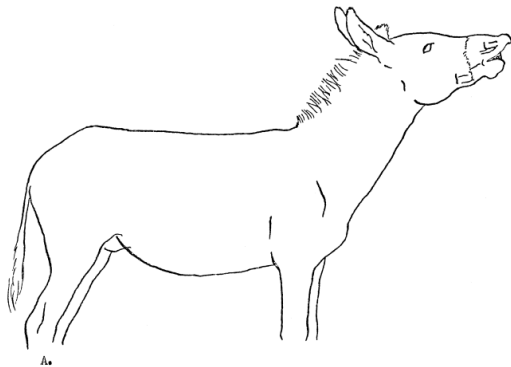


Figura 4. Flehmen, tratto da Moehlman, *Applied Animal Behaviour Science* (1998), 60:125-169.



Un ultimo importante fattore da considerare è la mancanza di chiare differenze nel comportamento sessuale tra un estro ovulatorio e un estro non ovulatorio, fatta eccezione per la lunghezza dell'estro (Henry et al., 1998), e quindi la mancanza di una garanzia dell'avvenuta ovulazione anche in presenza di un comportamento estrale.

Sono anche possibili estri silenti o caratterizzati da segnali di bassa intensità, o ancora estri interrotti da un periodo privo di comportamenti estrali, tutte irregolarità che possono comparire anche durante la stagione riproduttiva e con maggior frequenza in particolari individui (Henry et al., 1998).

2.4 Effetti della sfera riproduttiva sulle attività: problemi comportamentali, rischi per gli utenti

Il ciclo estrale è legato all'espressione di una serie di comportamenti che possono dare luogo a situazioni indesiderate per lo svolgimento di percorsi di onoterapia. I centri dove si svolgono IAA necessitano di animali sempre docili e prevedibili nei loro comportamenti per garantire la sicurezza degli utenti. L'interazione con animali in libertà e spesso in gruppo da parte di persone con disabilità sia fisiche che cognitive deve prevedere uno stato di assoluta quiete degli animali che possono così essere avvicinati in sicurezza. L'irrequietezza tipica della fase estrale e le dinamiche comportamentali che si instaurano in un gruppo sessualmente attivo possono turbare le condizioni di tranquillità e docilità richieste agli animali impegnati in queste attività. La presenza di animali che si montano o di femmine che calciano o mordono il maschio può costituire una fonte di pericolo per utenti eventualmente presenti nelle vicinanze. Inoltre non meno importante un animale in estro può non essere in grado di manifestare quelle doti di empatia e docilità necessarie alla buona riuscita del percorso terapeutico.

2.5 Metodi di contraccezione degli equidi. Effetti sulla ciclicità e sul comportamento

La contraccezione negli equidi è un argomento non molto studiato in quanto il maggior interesse è rivolto alla loro riproduzione e quindi a metodi rivolti al miglioramento delle performance riproduttive piuttosto che alla loro inibizione. L'argomento assume comunque importanza in alcuni ambiti di interesse come l'applicazione nell'ambito di centri specializzati in interventi assistiti con gli animali, come nel caso di questa trattazione, oppure nella gestione degli zoo dove il controllo dell'attività riproduttiva è di fondamentale importanza per il management della struttura, così come nella gestione di popolazioni di animali selvatici in cui la soppressione della fertilità è spesso necessaria a prevenire l'eccessiva crescita della popolazione rispetto alle capacità di ospitarla dell'habitat. Inoltre la tematica è stata studiata per l'applicazione in cavalle da competizione in cui i comportamenti indesiderati legati all'estro rappresentano un grosso deficit per la loro rendita sportiva.

I metodi contraccettivi si dividono innanzitutto in due tipologie, cioè quelli finalizzati all'inibizione riproduttiva nel maschio o quelli destinati alla femmina. Questi ultimi a loro volta si possono dividere in due macro categorie: i metodi che prevedono l'inibizione del ciclo estrale e quelli che impediscono il concepimento senza alterare in nessun modo la ciclicità.

Per i fini del nostro studio ci occuperemo di analizzare solo i metodi indirizzati al blocco della ciclicità, in quanto le altre tipologie non avrebbero risolto alcuno nell'utilizzo degli animali per lo svolgimento di IAA.

2.5.1 Progestinici ed estrogeni

Il progesterone è l'ormone responsabile del mantenimento in una fase diestrane e fino a quando questo ormone rimane alto nel sangue sopprime la fase finale di crescita del follicolo e la successiva ovulazione, evitando il manifestarsi dell'estro. Di conseguenza un semplice metodo per inibire il ciclo estrale è quello di somministrare dei progestinici all'animale.

È possibile la somministrazione di progesterone in olio iniettabile oppure di progestinici sintetici per via orale. La formulazione di progesterone naturale iniettabile solitamente non è usata per il blocco della ciclicità in quanto richiede iniezioni intramuscolari giornaliere al dosaggio di 100-150 mg che, oltre a non essere un metodo pratico a lungo termine, protrandosi possono causare gonfiore e dolore nella zona di inoculo (McCue, 2003).

Sebbene siano state testate varie tipologie di progestinici sintetici, l'unico efficace e approvato per l'uso nella cavalla al fine di inibire l'estro è l'altrenogest, un composto in vendita con il nome commerciale di Regumate®. L'efficacia limitata a questo unico composto è attribuibile alla specificità dei recettori per il progesterone nella cavalla (Nobelius, 1992). Regumate® viene somministrato per via orale con una cadenza giornaliera e può essere somministrato per lunghi periodi senza problemi per la fertilità futura (McCue, 2003).

Anche la somministrazione di estrogeni è stata sperimentata come possibile metodo contraccettivo negli equidi ottenendo il 100% dell'efficacia contraccettiva con impianti intraperitoneali contenenti 8 g di etinilestradiolo (Plotka et al., 1992). Purtroppo però alle dosi richieste per ottenere l'effetto contraccettivo è segnalata la comparsa di iperplasia e neoplasie degli organi contenenti recettori per gli estrogeni come l'endometrio, la ghiandola mammaria, l'ipofisi e il fegato (Gass et al., 1964). Per questo motivo gli estrogeni sono generalmente associati ad un progestinico al fine di mitigare il loro effetto sui tessuti target. Inoltre dal punto di vista comportamentale la somministrazione di estrogeni ha effetti rilevanti come la stimolazione del comportamento estrale (Asa et al., 1984) e nel caso di somministrazioni prolungate la comparsa di comportamenti tipicamente maschili (Nishikawa, 1959), probabilmente

causati da un'alterazione nel metabolismo degli steroidi a favore di una conversione in androgeni. È stato testato anche l'uso di impianti contenenti dosaggi inferiori di estrogeni associati al progesterone (8 dosi = 200 mg di progesterone e 20 mg di estradiolo benzoato); questi impianti sono registrati nel bovino con il nome di Synovex-S® per promuovere l'aumento di peso e si pensava potessero provocare l'inibizione dell'estro nella cavalla, dai test sperimentali è però emerso che la somministrazione di 8, 32 o anche 80 dosi di Synovex-S® non è comunque in grado di inibire il comportamento estrale e la ciclicità della cavalla, non essendo stata rilevata alcuna alterazione nei parametri riproduttivi in seguito alla somministrazione del prodotto (McCue et al., 1997).

In definitiva l'utilizzo degli estrogeni a scopo contraccettivo richiede dosi tali da risultare svantaggioso sia per la salute dell'animale che per gli effetti comportamentali indesiderati.

2.5.2 Immunocostraccezione

I metodi di immunocostraccezione sono sostanzialmente due: uno diretto contro la zona pellucida dell'embrione ed uno antagonista del GnRH. Per quanto riguarda il primo non verrà approfondito in questa trattazione per i motivi già menzionati, in quanto si tratta di una metodica che agisce impedendo il concepimento e che non causa rilevanti modificazioni della ciclicità o del comportamento nelle femmine inoculate (Liu et al., 1989).

L'altro tipo di vaccino usato per la costraccezione consiste nell'inoculo di GnRH coniugato con proteine estranee come ad esempio l'ovalbumina e con un adiuvante al fine di indurre la formazione di anticorpi anti-GnRH (Stout e Colenbrander, 2004).

Il GnRH è un ormone peptidico di origine ipotalamica responsabile della liberazione di FSH e LH a livello di ipofisi anteriore. Sta quindi alla base della catena che porta alla produzione di ormoni sessuali da parte delle gonadi ed è responsabile della regolazione di tutta l'attività riproduttiva.

Gli anticorpi prodotti grazie all'inoculo del vaccino legandosi al GnRH endogeno impediscono il suo legame con i recettori rimuovendo così lo stimolo al rilascio di gonadotropine; Il risultato è una diminuita produzione di FSH e LH, una mancata stimolazione delle gonadi a produrre ormoni steroidei e il blocco dello sviluppo follicolare e dell'ovulazione (Stout e Colenbrander, 2004). Questo tipo di vaccino, commercializzato per l'uso nel suino come Improvac[®], ha dimostrato di avere una buona efficacia nel provocare cambiamenti inibitori dei parametri endocrini, ovarici, uterini e comportamentali nella cavalla (Imboden et al., 2006). Anche altri studi effettuati con altre forme commerciali hanno ottenuto risultati analoghi con il 50% delle cavalle ancora inibite dopo 40 settimane dalla prima vaccinazione in una sperimentazione di Donovan et al. (2013) e con un'inibizione dalle 4 alle 23 settimane in 10 cavalle e in 6 cavalle per l'intera durata dello studio (34 settimane) di Elhay et al. (2007). In quest'ultimo studio sono stati ottenuti risultati ancora migliori per quanto riguarda i soli parametri comportamentali con assenza di segni estrali dalle 12 alle 29 settimane (Elhay et al., 2007).

In figura 5 possiamo vedere i risultati dello studio in questione effettuato con il vaccino Equity®. Le tabelle riportano l'attività riproduttiva individuale delle cavalle controllo (blocco in alto) e delle cavalle vaccinate (blocco in basso). Il diverso colore differenzia quando le cavalle hanno mostrato attività estrale o diestraltale (grigio chiaro) da quando apparivano in anestro (grigio scuro).

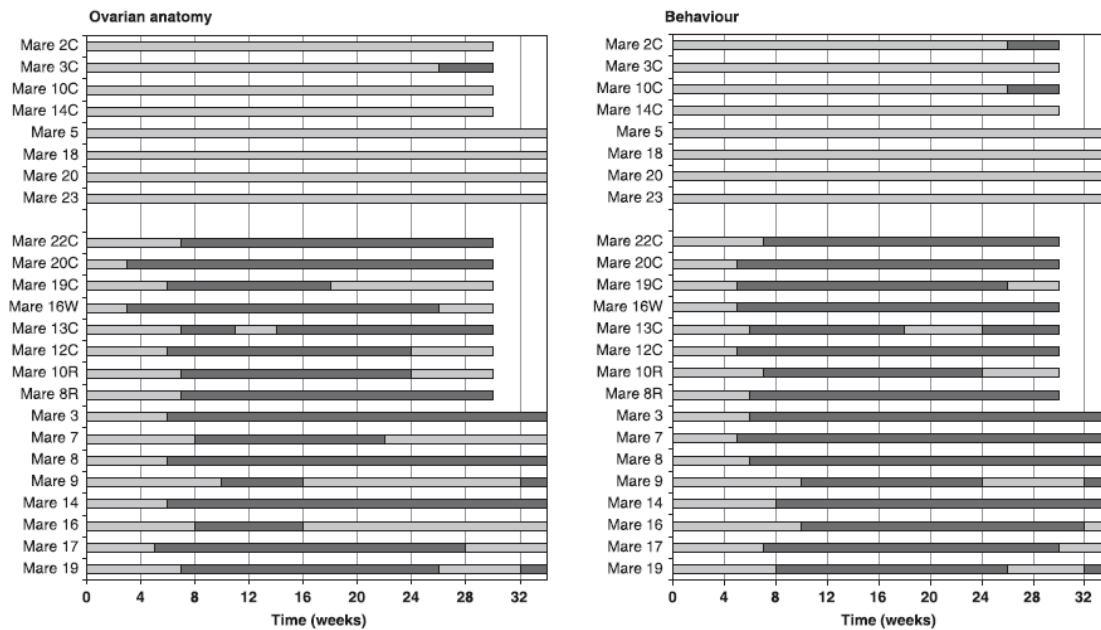


Figura 5. Tratto da Elhay et al., Aust Vet J (2007), 85:39-45

Nelle figure seguenti troviamo invece i risultati ottenuti nello studio di Donovan et al. (2013) per quanto riguarda la concentrazione del progesterone (fig.6), il titolo anticorpale (fig.7) e i comportamenti estrali (fig.8) pre e post vaccinazione in cavalle vaccinate con Canine Gonadotropin Releasing Factor Immunotherapeutic®.

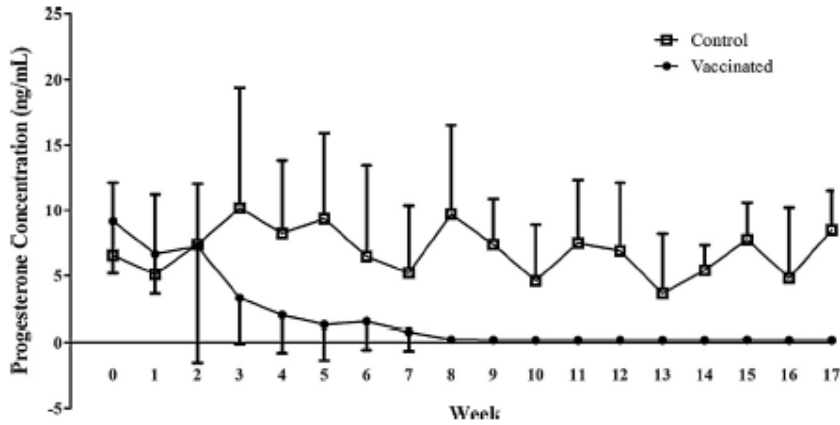


Figura 6. Concentrazione del progesterone in cavalle vaccinate e in cavalle controllo. Tratto da Donovan et al., *Animal Reproduction Science* (2013), 142: 42-47

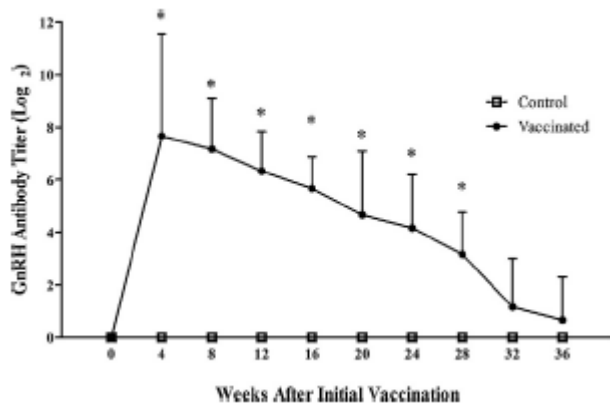


Figura 7. Titolazione anticorpi anti GnRH. Tratto da Donovan et al., *Animal Reproduction Science* (2013), 142: 42-47

Mare	Number of estrous behaviors present pre-vaccination	Number of estrous behaviors present post-vaccination
1	3	0
2	2	0
3	1	0
4	3	0
5	2	0
6	4	0
7	2	0
8	2	0
9	3	0

Figura 8. Numero dei comportamenti estrali pre e post vaccinazione. Tratto da Donovan et al., *Animal Reproduction Science* (2013), 142: 42-47

Differenze nella risposta individuale sono state riscontrate in tutti gli studi menzionati, quindi con varie tipologie commerciali di vaccino e, sebbene si supponga che queste variazioni nella risposta immunitaria siano basate sulle differenze genetiche tra gli

individui (Miller et al., 2000), in realtà non sono ancora state chiarite e sono da tenere in considerazione quando si fa uso di questa metodica (Donovan et al., 2013).

Infatti la comparsa dell'effetto è piuttosto variabile, con tempi compresi tra le 2 e le 7 settimane, range probabilmente giustificato anche dalle differenze nella fase del ciclo estrale in cui viene somministrato il vaccino (Imboden et al., 2006) e ancora maggiore è la variabilità nella ripresa dell'attività riproduttiva che da alcuni mesi può variare fino a ben oltre un anno.

Inoltre, come possiamo vedere in figura 9 e 10, delle significative differenze sono state riscontrate anche in relazione all'età: mettendo a confronto gruppi di cavalle di diversa età (gruppo 1: ≤ 4 anni, gruppo 2: 5-10 anni, gruppo 3: ≥ 11 anni) è stata rilevata una maggior durata dell'inibizione riproduttiva, correlata a livelli più alti di anticorpi anti-GnRH, nelle cavalle più giovani (Schulman et al., 2013).

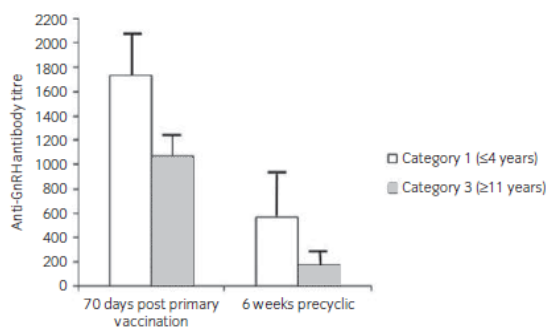


Figura 10. Media dei titoli anticorpali nelle due diverse categorie di cavalle. Tratto da Schulman et al., Equine Veterinary Journal (2013), 45:111-113

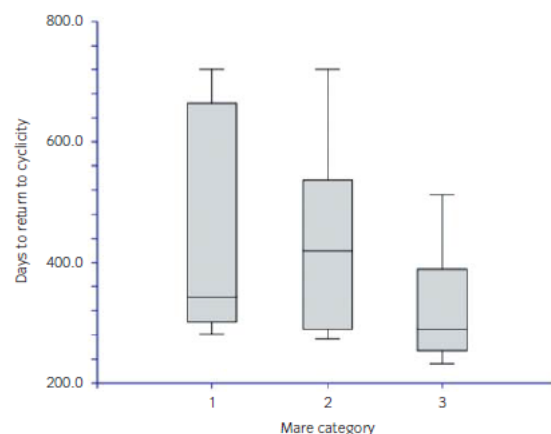


Figura 9. Giorni trascorsi prima del ritorno in estro nelle differenti categorie di età. Tratto da Schulman et al., Equine Veterinary Journal (2013), 45:111-113

Nonostante gli ottimi risultati ottenuti con questi prodotti rimangono alcune riserve in merito al loro utilizzo. Innanzitutto sono da considerare gli effetti indesiderati della vaccinazione che richiedendo l'uso di adiuvanti spesso causa reazioni locali e talvolta anche sistemiche. Con l'utilizzo di Improvac® si sono verificati gonfiore e dolore nel sito di inoculo, febbre, rigidità del collo e apatia; tali effetti, di durata e caratteristiche variabili individualmente, sono divenuti maggiormente rilevanti al momento dell'iniezione booster piuttosto che in occasione della prima immunizzazione (Imboden et al., 2006). Reazioni locali al sito di inoculo con visibile rigonfiamento sono state

riportate anche con l'utilizzo del vaccino Equity®; tutte si sono comunque risolte entro una settimana (Elhay et al., 2007).

Inoltre sono da tenere in conto l'alta variabilità nella risposta individuale, i potenziali effetti collaterali ancora sconosciuti, la necessità di almeno due somministrazioni e i costi, oltre alla pericolosità di un'eventuale auto-iniezione trattandosi di un vaccino attivo anche nell'uomo (Herbert e Trigg, 2005).

Particolarmente rilevante è la possibile esistenza di effetti collaterali ancora sconosciuti e la mancanza di studi sufficientemente prolungati e approfonditi circa la durata dell'inibizione e la fertilità futura. Schulman et al. (2013) hanno indagato la reversibilità dell'uso di Improvac® su un gruppo di 51 cavalle per un periodo di due anni. Di queste, 47 sono tornate ad una normale ciclicità nell'arco di 103 settimane dalla prima vaccinazione mentre le restanti 4, caratterizzate da un'età inferiore ai 4 anni, non hanno ripreso la loro normale attività riproduttiva.

In definitiva la reversibilità e l'effetto dell'immunizzazione contro il GnRH sulla fertilità sono sconosciuti; infatti Equity®, l'unico di questi vaccini registrato per l'uso nel cavallo, non è raccomandato per cavalle che si intenda far riprodurre in futuro (Pfizer Animal Health Australia, 2008).

Infine è rilevante ricordare che, poiché il vaccino ha un effetto soppressivo maggiore sull'LH piuttosto che sull'FSH, il comportamento sessuale nelle femmine potrebbe non essere inibito completamente (Thompson, 2000; Stout and Colenbrander, 2004; Imboden et al., 2006; Powers et al., 2011).

Infatti la soppressione dell'attività ovarica non sempre va di pari passo con l'inibizione del comportamento estrale poiché in assenza di concentrazioni significative di progesterone anche piccole quantità di estradiolo possono essere sufficienti ad indurre segni estrali (Imboden et al., 2006). Quindi una continuata produzione di FSH seguita dalla produzione di estrogeni potrebbe essere di supporto ad un comportamento estrale senza ovulazione.

Inoltre anche in assenza di ormoni ovarici possiamo avere una produzione di steroidi sessuali adrenalinici (come il DHEA, precursore degli estrogeni e del testosterone, che agisce sul recettore degli androgeni) che potrebbero influire sul comportamento riproduttivo.

2.5.3 Agonisti e antagonisti del GnRH

Come già menzionato in merito alla vaccinazione anti-GnRH, questo ormone è alla base dell'innesco della catena ormonale responsabile della crescita follicolare e dell'ovulazione. Per questo motivo il GnRH è molto studiato sia per l'inibizione dell'estro che per l'induzione dell'ovulazione. Si tratta di un target molto appetibile per la contraccezione poiché agisce sulle gonadotropine attraverso recettori specifici e ad alta affinità (Herbert e Trigg, 2005).

Oltre all'immunocontraccezione, le sostanze che ci permettono la manipolazione del ciclo estrale agendo sui recettori per il GnRH sono fondamentalmente di due tipi: gli agonisti e gli antagonisti del GnRH.

Gli agonisti del GnRH sono dei peptidi sintetici la cui struttura chimica deriva dal decapeptide GnRH. La loro struttura, la specificità di azione e la loro sicurezza ne fanno una soluzione ideale per una varietà di condizioni riproduttive in molti mammiferi, nella femmina così come nel maschio (Romagnoli et al., 2009).

La somministrazione di agonisti è stata molto studiata e utilizzata negli equidi per l'induzione dell'ovulazione; infatti il loro effetto iniziale è quello di iperstimolare la produzione di gonadotropine. Una somministrazione continua ad alte dosi di agonisti del GnRH induce però una desensibilizzazione ipofisaria con conseguente diminuzione del rilascio di gonadotropine. Questo meccanismo di base accomuna entrambe le tipologie di agonisti disponibili: quelli short-acting come il Lecirelin e il Buserelin e gli impianti a lento rilascio come il Deslorelin Acetato.

Nella tabella sottostante possiamo vedere una panoramica completa degli agonisti del GnRH disponibili in commercio (figura 11).

GnRH name	Type of product (relative to GnRH)	Chemical formula with substitution in position(s)	Available as	Length of action	Route of administration
Gonadorelin	Synthetic form of GnRH		Veterinary drug	Hours	IM
Lecirelin	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Veterinary drug	Hours	IM, EV
Buserelin	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Vet/human drug	Hours	SC or IM (vet), SC or nasal spray (human)
Deslorelin	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Veterinary drug	6 months	SC
Nafarelin ^a	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Vet/human drug	6 months	SC (vet), nasal spray (human)
Histrelin	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Human drug	1 month	SC
Goserelin	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Human drug	1 month	SC
Leuprolide	Synthetic analogue of gonadorelin	6 and 10	Human drug	1 day to 12 months	IM, SC
Triptorelin	Synthetic analogue of gonadorelin	6	Human drug	1 month	IM

^aNot commercialized yet as a veterinary drug.

Figura 11. Agonisti del GnRH. Tratto da Romagnoli et al., *Reproduction Domestic Animals*, 2009, 44 (Suppl.2):36-39

Per ottenere un effetto contraccettivo e quindi di inibizione del ciclo estrale il prodotto più indicato è l'impianto sottocutaneo di deslorelin acetato a lento rilascio, grazie alla sua lunga durata d'azione in seguito ad un'unica somministrazione. In quanto oggetto di principale interesse di questa trattazione, la sua efficacia e i suoi effetti verranno trattati più nello specifico nel capitolo 2.6.

Per quanto riguarda invece gli antagonisti del GnRH come antarelix o cetrotorelix, questi occupano competitivamente i recettori del GnRH impedendo a quest'ultimo di esplicare la sua azione. Dosi giornaliere di antarelix o cetrotorelix per un minimo di 6 giorni sopprimono la secrezione di FSH e LH e possono inibire il ciclo ovarico (Evans et al., 2002). Si tratta di una buona alternativa alla somministrazione di alte dosi di agonisti, con il vantaggio di un'azione più rapida senza un'iniziale stimolazione del rilascio di gonadotropine e con un effetto velocemente reversibile, il loro utilizzo però è limitato dalla necessità di somministrazioni ripetute e dal costo elevato (Stout e Colenbrander, 2004).

2.5.4 Altre metodiche

Tra le altre metodiche quella che può apparire più ovvia è la sterilizzazione chirurgica degli animali tramite rimozione delle ovaie. Questa soluzione, molto praticata nel campo dei piccoli animali, comporta maggiori difficoltà nel caso degli equini in quanto richiede il trasporto in una clinica specializzata, quindi prevede costi abbastanza elevati, non è esente da rischi, sia chirurgici che anestesiológicos, ma soprattutto presenta il problema della non reversibilità nel caso in futuro il proprietario decidesse di adibire l'animale alla riproduzione. Inoltre l'ovariectomia, pur azzerando l'attività riproduttiva, non elimina del tutto la possibilità del manifestarsi di comportamenti estrali: infatti è descritta la manifestazione di comportamenti estrali in cavalle sottoposte ad ovariectomia (Asa et al., 1980).

Un'altra possibilità su cui sono stati condotti vari studi è la collocazione di sfere di vetro (o altri materiali come plastica o marmo) nell'utero che rotolando mimano la presenza e la motilità dell'embrione alterando la secrezione di prostaglandine da parte dell'endometrio e permettendo così la persistenza del corpo luteo e il mantenimento in una fase di diestro. In uno studio Nie et al. (2003) hanno riportato che l'inserimento di sfere di vetro sterili di diametro compreso tra i 25 e i 35 mm subito dopo l'ovulazione porta nel 40% delle cavalle che non la espellono ad un mantenimento della funzione del corpo luteo per circa 90 giorni. In tale modo il progesterone si mantiene elevato e la cavalla rimane in uno stato di diestro.

Sebbene questo metodo sia diventato popolare grazie al costo ridotto e alla semplicità del protocollo, il suo utilizzo è fortemente sconsigliato a causa di gravi complicazioni ad esso associate quali: piometra, endometriti croniche, rottura della sfera nel lume uterino, coliche intermittenti croniche, inserimento accidentale di due o più sfere, formazione di aderenze tra la sfera e l'endometrio (Klabnik-Bradford et al., 2013; Diel de Amorim et al., 2016; Freeman e Lyle, 2015; Turner et al., 2015; Morris et al., 2017).

Inoltre il rischio non è giustificato se confrontiamo la percentuale di persistenza del corpo luteo ottenuta nello studio di Nie et al. (2003) che è pari all' 11% con l'incidenza spontanea di persistenza del corpo luteo nelle cavalle controllo dello stesso studio pari all'8% e ancor più se la paragoniamo all'incidenza stimata da Stabenfeldt et al. (1974) e

Sharp (1980) in generale nella popolazione di cavalle che è compresa tra il 5 e il 20%; quindi associando l'inefficienza nella soppressione dell'estro ai potenziali problemi legati all'uso di questa metodica possiamo definirla una pratica non etica (Morris et al.,2016). Infine rimane da prendere in considerazione il trattamento con ossitocina che può essere usata per prolungare la funzione del corpo luteo. Nella cavalla non gravida alla fine della fase di estrus la secrezione pulsatile di ossitocina da parte della neuroipofisi stimola l'utero a produrre prostaglandine esercitando quindi un effetto pro-luteolitico, ma se somministrata a metà della fase di diestro quando i recettori endometriali per l'ossitocina e gli enzimi per la sintesi di prostaglandine sono presenti in basse concentrazioni, non solo non riesce a stimolare la secrezione di prostaglandine ma esercita anche un'azione anti-luteolitica (Vanderwall et al., 2016). La somministrazione nella cavalla di 60 UI di ossitocina IM una volta al giorno dal giorno 7 al giorno 14 post-ovulazione si è dimostrato un metodo efficace e sicuro per la soppressione dell'estro e dei comportamenti ad esso correlati per un periodo dai 2 ai 3 mesi tramite il prolungamento dell'attività del corpo luteo, con l'ulteriore vantaggio di una semplice e veloce reversibilità tramite la somministrazione di prostaglandine (Vanderwall et al., 2016).

2.6 Il deslorelin acetato a lento rilascio

Il deslorelin acetato è commercializzato in due formulazioni: una a breve durata d'azione (Ovuplant®) registrata per l'uso nel cavallo e un impianto sottocutaneo a lento rilascio commercializzato come Suprelorin® e registrato per l'uso nel cane maschio.

Nel caso del Suprelorin® abbiamo il principio attivo, un agonista del GnRH, posto in una matrice che ne permette un rilascio lento e controllato per mantenere dosaggi costanti nel corpo dell'animale. In tal modo è possibile rendere più efficace e duraturo l'effetto di desensibilizzazione ipofisaria provocato dal deslorelin. Grazie alla sua facilità d'uso, biocompatibilità, lunga durata e al suo costo limitato, il Suprelorin® è impiegato con successo per l'inibizione della ciclicità in molte specie (Trigg et al., 2006).

Infatti la continua presenza di alte dosi di GnRH agonisti e quindi la mancanza della fisiologica secrezione pulsatile dell'ormone provoca una desensibilizzazione dei recettori delle cellule ipofisarie deputate alla produzione di FSH e LH, con conseguente inibizione dello stimolo all'attività ovarica e arresto della ciclicità.

L'effetto del deslorelin e la sua efficacia nella prevenzione dell'attività riproduttiva è però variabile a seconda delle specie in cui viene impiegato. Inoltre è presente un ampio range di variazione individuale circa il tempo necessario per la ripresa del ciclo estrale; questa variabilità può essere il risultato di fattori genetici individuali ed è spesso maggiore a basse dosi, il che potrebbe suggerire la presenza di una relazione dose-dipendente in cui una certa dose può essere sotto soglia per alcuni individui (Herbert e Trigg, 2005).

In merito all'effetto dose-dipendente, molti studi suggeriscono che con l'uso di dosi maggiori di GnRH agonisti si potrebbe ottenere un effetto contraccettivo di durata maggiore (Herbert e Trigg, 2005). Una correlazione positiva tra la dose di agonisti e la durata della soppressione è stata osservata nel cane maschio (Trigg et al., 2001) e nelle vitelle (D'Occhio et al., 2002). I motivi e l'esatta natura di questa correlazione però non sono ancora ben chiari ed inoltre questo aspetto non vale per tutte le specie (Herbert e Trigg, 2005).

Uno svantaggio nell'impiego contraccettivo del deslorelin è la stimolazione iniziale alla produzione di gonadotropine che può indurre l'estro in alcune specie.

Un aspetto positivo invece che occorre sottolineare è la provata sicurezza dell'uso di GnRH agonisti che non provocano seri effetti collaterali, i quali sono limitati ad occasionali e transitorie reazioni al sito di inoculo (Herbert e Trigg, 2005).

2.6.1 Effetti nella cavalla

Alle dosi adeguate gli agonisti del GnRH sono attivi potenzialmente in tutte le specie di mammiferi ma non sono stati testati specificatamente come contraccettivi negli equidi. Infatti in genere l'uso che viene fatto nella cavalla di questi principi attivi è finalizzato all'induzione dell'ovulazione. In seguito alla messa in commercio negli Stati Uniti di Ovuplant® per l'induzione dell'ovulazione, dal suo utilizzo in campo è emerso che alcune cavalle trattate avevano mostrato un prolungato intervallo interovulatorio o il completo anestro (Johnson et al., 2002). Infatti il potenziale effetto inibitorio dei GnRH agonisti è stato rilevato anche nel corso di studi finalizzati all'induzione dell'ovulazione con Ovuplant® in cui è stato rilevato un allungamento dell'intervallo interovulatorio con un prolungamento di tale intervallo con una media di circa 6 giorni (fig. 12)(Johnson et al., 2000).

Characteristic	Control	Treated	SEM	P value
Number of mares	11	11		
Follicle size at treatment, mm	36.2	35.5	1.21	.713
Follicle size, mm before ovulation	42.4	37.9	1.33	.037
Treatment to ovulation, days	3.4	2.8	0.49	.438
Number ovulating within 48 h (%)	3/11 (27.3%)	7/11 (63.6%)		.095
Number ovulating within 72 h (%)	6/11 (54.5%)	10/11 (90.9%)		.059
Interovulatory Interval, days	15.8	22.0	0.60	.0001

Figura 12. Confronto dei parametri riproduttivi tra cavalle trattate con Ovuplant e cavalle controllo. Tratto da Johnson et al., Journal of Equine Veterinary Science (2000), vol. 20, N° 5

In uno studio successivo il prolungamento riportato è stato di circa 4 giorni (fig. 13) (Johnson et al., 2002).

Item	Control	Deslorelin	SEM	P-value
Treatment to ovulation, d	4.0	2.0	0.26	0.0003
Interovulatory interval, d	21.0	25.4	1.2	0.036
Size of the largest follicle, mm:				
Day of treatment	34.0	33.8	0.8	0.892
Day 1 before ovulation	41.5	40.0	1.1	0.360
Day of ovulation	17.7	20.7	2.2	0.356
Day 1 after ovulation	15.3	22.3	1.5	0.007
Day 4 after ovulation	19.7	15.3	3.1	0.339
Day 7 after ovulation	15.0	16.2	1.5	0.605
Day 10 after ovulation	19.2	13.0	1.6	0.021

Figura 13. Confronto tra cavalle trattate con Ovuplant e cavalle controllo. Tratto da Johnson et al., J. Anim. Sci., (2002), 80:2681-2687

Sempre questo studio di Johnson et al. (2002) ha evidenziato nelle cavalle in cui viene indotta l'ovulazione con deslorelin acetato la secrezione di gonadotropine sia soppressa a causa di una desensibilizzazione all'effetto del GnRH per almeno 7 giorni dopo l'ovulazione indotta; infatti in figura 14 vediamo come l'area sotto la curva per la risposta al GnRH dell'LH e dell'FSH sia più bassa nelle cavalle trattate con deslorelin.

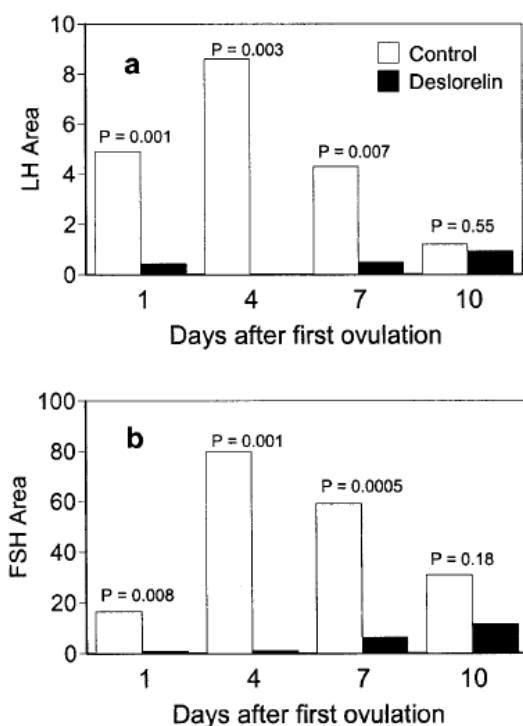


Figura 14. Area sotto la curva per la risposta al GnRH di LH e FSH. Tratto da Johnson et al., J. Anim. Sci., (2002), 80:2681-2687

Inoltre pare che alcuni soggetti siano maggiormente sensibili all'effetto inibitorio dei GnRH agonisti. Nello studio di Johnson et al. (2000) su 25 cavalle, due di queste hanno manifestato un'inibizione della ciclicità più marcata rispetto alle altre; una ha ovulato per la seconda volta 31 giorni dopo il trattamento, l'altra è stata soggetta ad un'inattività ovarica per diversi mesi.

Ma sebbene in alcune cavalle avvenga un completo blocco dell'attività riproduttiva questo effetto è sporadico ed è difficile da indurre anche con l'uso di alte dosi di GnRH tramite l'impiego di più impianti di deslorelin contemporaneamente, che pur portando l'allungamento dell'intervallo interovulatorio ad una media di 14 giorni (fig. 15) è ancora lontano da un'inibizione a lungo termine (Johnson et al., 2003).

Item	Control	Des 3-1d	Des 1-3d	SEM	P-value ^a
Treatment to ovulation, d	3.9	3.3	2.1	0.79	0.32
Interovulatory interval, d	22.5	36.8	36.9	2.06	0.0004
First estrus length, d	6.33	7.14	4.71	1.08	0.297
Second estrus length, d	5.75	12.6	14.1	2.73	0.205
Return to estrus, d	16.0	27.0	23.0	2.57	0.089
Largest follicle at treatment, mm	32.4	32.7	34.1	0.60	0.128

^aDifferences among means were assessed via the LSD test.

Figura 15. Confronto tra cavalle controllo, cavalle trattate con 3 impianti di deslorelin in 1 giorno e cavalle trattate con 3 impianti in 3 giorni consecutivi. Tratto da Johnson et al., J. Anim. Sci., (2003), 81:1300-1307

Quindi, nonostante il frequente rilievo di periodi interovulatori prolungati in seguito all'utilizzo di GnRH agonisti, la cavalla sembra essere più resistente alla desensibilizzazione ipofisaria rispetto alle altre specie (Porter e Sharp, 2002). Infatti l'inibizione tende ad essere di breve durata e la maggior parte dei cavalli sono resistenti ad una soppressione riproduttiva profonda e di lunga durata con questi agenti (Stout e Colenbrander, 2004).

2.6.2 Effetti in altri mammiferi

Mentre nella cavalla l'efficacia come metodo contraccettivo è piuttosto deludente, altre specie rispondono molto bene a questo impiego del deslorelin.

Nella tabella sottostante (fig. 16) è presentata l'efficacia e la durata contraccettiva di trattamenti con formulazioni a lento rilascio di agonisti del GnRH in diverse specie di mammiferi.

Species	Agonist	Dose (mg)	N	Oestrus induction	Infertile (%)	Duration (mean ± S.E.M.) (range) (days) ^a	Reference
Cats	Suprelorin	6	C=5 T=5	Yes ^b	100 ^b	333 ± 39 (240–420)	Munson et al. (2001)
Cats	Suprelorin	12	C=5 T=5	Yes ^b	100 ^b	330 ± 31 (225–420)	Munson et al. (2001)
Dogs	Suprelorin	3 6 12	T=8 T=8 T=9 C=10	Yes (50%)	100 ^{c,d}	321 ± 42 ^{c,d} 438 ± 105 465 ± 51 165 ± 15	Trigg et al. (2001)
Heifers	Suprelorin	8 8 12	T=76 T=84 T=99 C=59	?	97 ^{e,f} 100 ^{e,f} 100 ^{e,f}	231 ± 3 (n=9) 244 ± 13 (n=8) 336 ± 3 (n=20)	(D'Occhio et al., 2002)
Heifers	Buserelin	6 12	T=5 T=5	?	100 ^e	48.4 ± 3.8 87.4 ± 17.4	D'Occhio et al. (1996)
Heifers	Suprelorin	5 10	T=8 T=9	?	88 ^e 100 ^e	203 ± 26 (111–280) 170 ± 28 (70–280)	D'Occhio et al. (1996)
Wapiti	Leuprolide	32.5	T=4 C=5	?	100 ^{e,f}	225	Baker et al. (2002)
Cheetahs	Suprelorin	6 12	T=8 T=8	Yes (31%)	100 100	>485 ^{c,d} >640 ^{c,d}	Bertschinger et al. (2001) Bertschinger et al. (2002)
Wild dogs	Suprelorin	6	T=6	?	83	365 ^c	Bertschinger et al. (2001)

N, number of treated (T) and control (C) animals; >, trial ongoing and animals still to breed; n, refers to the number of animals the mean was calculated from (i.e. calculated on the first animals to resume cycling).

^a Single values represent the earliest resumption of reproductive activity in the group.

^b Determination of fertility/oestrus based on plasma oestradiol.

^c Determination of fertility/oestrus based on plasma progesterone.

^d Determination of fertility/oestrus based on vaginal cytology.

^e Determination of fertility/oestrus based on ovarian histology.

^f Determination of fertility/oestrus based on pregnancy/birth.

Figura 16. Efficacia contraccettiva dei GnRH agonisti in diverse specie. Tratto da Herbert e Trigg, *Animal Reproduction Science*, (2005), 88:141-153

Ad esempio una specie che risponde particolarmente bene al trattamento con Suprelorin® è il gatto, animale in cui si instaura un'inibizione riproduttiva di lunga durata. Impianti da 6 o 12 mg di deslorelin sopprimono la secrezione di estradiolo per almeno 14 mesi nell'80% delle gatte (Munson et al., 2001).

In uno studio più recente su 21 gatte, 19 di queste non hanno mostrato segni di estro per almeno 18.5 mesi in seguito all'impianto con 9.5 mg di deslorelin (Toydemir et al., 2012).

Nella cagna la durata dell'effetto è variabile dai 10 ai 15 mesi circa in base al dosaggio dell'impianto utilizzato (3, 6 o 12 mg di deslorelin), con una risposta da parte di tutti gli animali trattati (Trigg et al., 2001).

Ottimi risultati sono stati ottenuti anche nella vacca con l'inibizione riproduttiva per più di 300 giorni nel 100% degli animali e più di 400 giorni nel 90% degli animali in seguito alla somministrazione di impianti da 12 mg di deslorelin (D'Occhio et al., 2002).

Metodi per l'inibizione dell'estro	Efficacia	Durata	Reversibilità	Inibizione del comportamento	Sicurezza	Praticità d'uso
Progestinici	Buona	Richiedono Somministrazioni giornaliere	Si	Si	Buona	Scarsa
Estrogeni	Si	-----	Si	No	Effetti negativi sulla salute	-----
Vaccino anti GnRH	Si ma soggetta a variabilità individuale	Da alcune settimane a oltre un anno	Non accertata, specialmente in cavalle giovani	Si ma non sempre	Si ma mancano studi sugli effetti a lungo termine	Buona, ma richiedono Almeno 2 iniezioni
Agonisti del GnRH	Scarsa (esistono soggetti più sensibili in cui l'efficacia è maggiore)	Pochi giorni	Si	Si	Ottima	Ottima
Antagonisti GnRH	Buona	----	Si	Si	----	Scarsa
Ossitocina	Buona	2-3 mesi	Rapida	Si	Si	Scarsa
Sfere uterine	Scarsa	3 mesi	Si	Si	No, sono riportati molti rischi correlati	Ottima
Sterilizzazione	Ottima	Per tutta la vita dell'animale	No	Si (segnalate manifestazioni di estro)	Rischio operatorio e anestesiologicalo	Necessità di trasporto in clinica

Tabella 2. Prospetto riassuntivo sui metodi contraccettivi nella cavalla

2.7 Obiettivi dello studio

L'obiettivo di questo studio è quello di testare l'efficacia di impianti di deslorelin acetato a lento rilascio per l'inibizione del ciclo estrale nelle asine, test di cui non abbiamo precedenti in letteratura.

Più nello specifico ci si propone di capire se questi impianti possano essere efficaci per prevenire la comparsa del ciclo estrale con il suo tipico pattern comportamentale, inibendo o limitando le manifestazioni estrali.

Si vuole comprendere se in questa specie l'efficacia del principio attivo è tale da renderlo una soluzione praticabile per ottemperare alle linee guida ministeriali per lo svolgimento di IAA senza rinunciare all'utilizzo delle asine durante la stagione riproduttiva.

Infatti la sua praticità d'uso, l'assenza di effetti collaterali e il costo accessibile lo rendono un metodo contraccettivo molto appetibile e che ben si può adattare alle necessità del contesto per cui viene proposto.

Facendo riferimento agli studi sulla cavalla è ipotizzabile che non ci si possa aspettare una lunga durata degli impianti dal punto di vista riproduttivo, si vuole però verificare se sia presente un effetto disgiunto che porti invece a buoni risultati dal punto di vista comportamentale.

Inoltre considerato il ruolo specifico delle asine oggetto di studio come animali impiegati in IAA, si vogliono rilevare eventuali effetti sul comportamento in senso più ampio e non solo legati alle manifestazioni estrali, in modo da capire se il deslorelin possa avere risvolti positivi sulle dinamiche di gruppo tra gli asini e sulle dinamiche di interazione tra asino e persona.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Struttura e animali

Lo studio, condotto nei mesi di Luglio e Agosto 2016, è stato svolto presso “La città degli asini”, centro specializzato nello svolgimento di IAA con gli asini sito a Polverara (PD), frequentato da bambini e ragazzi con disabilità, ma anche da famiglie e scolaresche.

Il gruppo di animali oggetto di studio è costituito da 8 delle asine presenti nel centro, le quali vivono in un gruppo sociale più ampio, costituito da 13 animali di cui 3 castroni.

Tutti gli asini presenti in questo centro vengono regolarmente utilizzati per lo svolgimento di IAA.

Essi vivono in un paddock esterno suddiviso in due parti adiacenti e comunicanti, in cui è presente un box coperto di libero accesso per gli animali, di dimensioni tali da permettere a tutti di stare al suo interno.

Il recinto è dotato di abbeveratoi e di una grande mangiatoia in grado di dare accesso contemporaneo all'alimento a tutti gli animali.

La razione giornaliera di alimento, costituito da fieno, viene somministrata una volta al giorno intorno alle ore 9 del mattino.

Le asine incluse nello studio (tabella 3) hanno età comprese tra i 5 e i 12 anni e sono state selezionate sulla base di:

- nessuna storia di cicli estrali irregolari in anamnesi
- assenza di scolo vulvare
- assenza di segni clinici suggestivi di patologie endocrine o di gravidanza
- conferma dello stato di salute riproduttiva tramite visita clinica ed ecografica

Nome asina	Anno di nascita	Foto
GIGLIOLA	2011	
CLEOPATRA	2006	
MICHELA	2007	
ROSSA	2004	
EVA	2010	




PENELOPE	2006	
KEKA	2004	
GINEVRA	2010	

Tabella 3. Presentazione degli animali impiegati per lo studio

3.2 Impianto

Il periodo scelto per lo studio, ha permesso di avere tutti gli animali in una fase di normale ciclicità evitando interferenze legate alla stagionalità.

Nel periodo compreso tra Maggio e Giugno le 8 asine sono state monitorate per verificare la loro effettiva ciclicità, confermando ecograficamente la presenza di edema endometriale e di follicoli di almeno 30 mm di diametro nel momento in cui i proprietari segnalavano la presenza di manifestazioni estrali.

Il trattamento con Suprelorin® 4.7 mg (fig. 17) è stato preceduto da una sincronizzazione del ciclo estrale e seguito da un monitoraggio della funzionalità riproduttiva.

La sincronizzazione è stata effettuata mediante due somministrazioni di PGF2 α come già riportato nell'asina nello studio di Blanchard et al. (1999), nello specifico tramite l'iniezione i.m. nella regione del collo di 4 mg/capo di alfaprostolo, analogo della PGF2 α (Gabbrostim®, CEVA VETEM S.p.a., AG;).

Le due prostaglandine sono state somministrate a distanza di 12 giorni e l'impianto è avvenuto 4 giorni dopo la seconda somministrazione.

Le 8 asine hanno quindi ricevuto 2 impianti sottocutanei da 4.7 mg di deslorelin ciascuna, collocati al di sotto della mucosa del labbro vulvare dorsale. Prima dell'inserimento dell'impianto è stato inoculato 1 ml di anestetico locale nel sito di impianto.



Figura 17. Confezione di Suprelorin® 4.7mg

3.3 Monitoraggio riproduttivo

In seguito all'impianto è stato effettuato un monitoraggio riproduttivo della durata di 35 giorni tramite prelievi di sangue dalla vena giugulare ed ecografie trans rettali.

3.3.1 Ecografie

Le ecografie sono state eseguite con cadenza settimanale nel giorno di inattività delle asine per evitare stress che potesse interferire con il regolare svolgimento degli IAA, trattandosi di una manualità a cui le asine non erano abituate. Per questo stesso motivo purtroppo non c'è stata disponibilità da parte del proprietario ad effettuare un monitoraggio con maggior frequenza. Le ecografie sono state effettuate su tutte le asine al momento T1, T8, T16, T21, T28, T35 post-impianto tramite ecografo ExaGo (Multimage) con sonda lineare transrettale da 7,5 MHz.

In tutte le ecografie sono state valutate:

- Presenza di edema endometriale
- Presenza o meno di follicoli di dimensioni ≥ 20 mm in entrambe le ovaie
- Presenza o meno di un corpo luteo distinguibile ecograficamente

3.3.2 Dosaggi ormonali

I prelievi di sangue sono stati effettuati su tutte le asine al momento T0, T8, T16, T24 e T35 (con T0= giorno dell'impianto). La sede del prelievo è stata in tutti i casi a livello della vena giugulare e sono state utilizzate provette sterili sottovuoto senza l'aggiunta di anticoagulante. I campioni sono stati poi sottoposti a centrifugazione e stoccaggio del siero in congelatore a -20C°.

Il siero ricavato è stato utilizzato per il dosaggio di progesterone, estrogeni e DHEA.

I dosaggi di tali ormoni sono stati ottenuti mediante analisi radioimmunologica(RIA) previa estrazione del campione con solvente (tabella 4).

Ormone analizzato	Volume plasma estratto	Tipo e volume solvente	Volume tampone RIA
P4	0,2 ml	Etere di petrolio 8 ml	0,2 ml
E2	4 ml	Etere dietilico 8 ml	0,2 ml
DHEA	0,5 ml	Etere dietilico 8 ml	0,2 ml

Tabella 4. Ormoni da dosare, volume di plasma estratto, quantità e tipologia del solvente, volume del tampone RIA.

Le metodiche sono state sottoposte a validazione per la specie in oggetto.

In particolare è stata utilizzata una variante di RIA su fase solida che prevede l'utilizzo di micropiastre da 96 pozzetti (Battocchio et al. 1998; Gabai et al. 2003; Marinelli et al. 2007).

Si tratta di un sistema di analisi dotato di elevata affinità e specificità grazie all'uso di un anticorpo che lega selettivamente la sostanza da dosare.

Infatti la metodica si basa sulla competizione tra l'analita da quantificare ed un antigene libero marcato con tracciante radioattivo per il legame con un anticorpo comune, presente in difetto rispetto alla quantità di antigeni.

Maggiore è la quantità di analita presente nel campione, minore sarà la quantità di tracciante radioattivo che riuscirà a legarsi agli anticorpi appositamente predisposti nel pozzetto.

Come anticorpo secondario è stato utilizzato un anticorpo anti- γ globuline di coniglio diluito 1:1000 con tampone sodio acetato 0,15 mM PH 9, posto nei 96 pozzetti della piastra che in seguito è stata incubata a 4 °C overnight. Una volta svuotata, caricata con 200 μ l di tampone RIA per pozzetto, incubata per 1 ora a 4°C e nuovamente svuotata, la piastra è pronta all'utilizzo.

A questo punto è stata caricata con 200 μ l della soluzione antisiero contenente l'anticorpo specifico per l'analitanda quantificare ed incubata a 4°C overnight. L'anticorpo è stato posto in tutti i pozzetti ad eccezione di quelli dedicati ai parametri di controllo AT (Attività Totale) e NSB (Non SpecificBound).

La piastra è stata quindi lavata con tampone RIA e caricata con 20 μ l di plasma diluito con tampone RIA fino al raggiungimento di 200 μ l/pozzetto. Sono stati poi aggiunti in ogni pozzetto 10 μ l di tracciante radioattivo diluito con etanolo e tampone RIA.

La piastra, coperta con una pellicola, è stata posta su un agitatore orizzontale per 3 minuti e incubata a 4°C overnight.

Un nuovo lavaggio con tampone RIA è servito a separare e rimuovere l'antigene marcato rimasto libero. A questo punto l'aggiunta di 200 μ l di liquido scintillante ha permesso di quantificare il tracciante radioattivo legato tramite lettura con β -counter che elabora la curva di taratura e fornisce le concentrazioni ormonali presenti nei campioni in pg/pozzetto.

L'allestimento della curva di taratura è stato effettuato dosando quantità note di ormone non marcato a concentrazioni crescenti.

Per quanto riguarda invece l'affidabilità e l'accuratezza della metodica, queste sono state garantite grazie all'allestimento di pozzetti di controllo.

3.4 Studio etologico

A differenza del monitoraggio riproduttivo, lo studio etologico condotto sugli animali ha avuto inizio 4 giorni prima degli impianti al fine di permettere un confronto tra il comportamento della stessa asina prima e dopo l'impianto. In tal modo ogni asina funge da controllo di se stessa ed è possibile osservare eventuali differenze riconducibili all'effetto del deslorelin.

Lo studio etologico si compone di quattro diverse parti:

1. Monitoraggio del comportamento estrale
2. Osservazioni sociali sull'intero gruppo di asini
3. Osservazioni di eventi in cui le asine interagiscono con persone sconosciute
4. Questionari per gli operatori della città degli asini

La raccolta dei dati comportamentali è stata effettuata mediante l'utilizzo di:

- Una videocamera per la realizzazione di brevi filmati
- Una scheda pre-impostata per la registrazione dei comportamenti sociali, da compilare durante lo svolgimento delle osservazioni sociali (vedi allegato 1)
- Un questionario per la valutazione del comportamento di ogni singola asina oggetto di studio da somministrare agli operatori nel periodo pre-impianto e in seguito in quello post-impianto (vedi allegato 2)

3.4.1 Monitoraggio del comportamento estrale

In seguito all'impianto del deslorelin è stato chiesto agli operatori della città degli asini, i quali ben conoscono gli animali e sono in contatto con loro quotidianamente, di annotare su un diario ogni comportamento estrale eventualmente osservato nelle asine oggetto di studio. Inoltre anche in occasione delle giornate di osservazione etologica sono stati annotati i comportamenti estrali manifestati dalle asine.

I comportamenti estrali considerati sono (Vandeplassche et al., 1981; Henry et al., 1998; Mc Donnell, 1998; Moehlman, 1998):

- Masticazione a vuoto: apertura e chiusura della bocca tramite movimenti verticali della mandibola con le labbra che coprono i denti, la testa abbassata e le orecchie tenute indietro.
- Monta: un asino, maschio o femmina, sale sulla groppa di una femmina con gli arti anteriori.
- Lampeggiamento del clitoride: ritmica eversione delle labbra vulvari con esposizione del clitoride.
- Flehmen: postura caratterizzata da testa sollevata con naso proteso verso l'alto, collo teso e labbro superiore arricciato verso l'alto che lascia scoperti i denti e le gengive superiori.
- Urinazione frequente: fuoriuscita all'esterno di urina e probabilmente di fluidi del tratto genitale.

L'asina è stata considerata in estro laddove manifestasse ripetutamente almeno due di questi comportamentinella stessa giornata di osservazione.

Nelle immagini seguenti (fig. 18 e 19) è mostrata una tipica sequenza di manifestazioni estrali.



Figura 18. Asina in estro mentre mastica a vuoto e viene montata da un'altra



Figura 19. Asina in estro che urina subito dopo essere stata montata da un'altra asina

3.4.2 Osservazioni sociali

Sono state condotte 8 osservazioni in continuo, *continuous behavioural sampling* (Martin e Bateson, 1993), della durata di un'ora su tutto il gruppo di asini, sempre in una fascia oraria compresa tra le 7.30 e le 9 del mattino. Uno studio condotto in precedenza su questo stesso gruppo di animali ha evidenziato come in questa fascia oraria, che corrisponde alla fase che va dal risveglio all'arrivo della razione di fieno quotidiana, gli asini siano maggiormente attivi e dediti alle interazioni sociali rispetto ad altri momenti della giornata (Visentin, 2016).

Delle 8 osservazioni totali, 4 sono state effettuate nel periodo pre-impianto e 4 nel periodo post-impianto.

Le osservazioni sono state condotte sempre dallo stesso operatore. Per garantire un'adeguata formazione dell'osservatore, si è svolto un training iniziale al fine di permettere il corretto riconoscimento degli asini e sono state fatte 2 osservazioni di prova prima dell'inizio vero e proprio dello studio.

Durante ogni osservazione è stata compilata l'apposita scheda (fig. 20) sulla quale sono stati riportati tutti i comportamenti sociali manifestati dagli animali nell'arco dell'ora di osservazione, segnalando ora di inizio e fine del comportamento, attore, ricevente ed eventuali note.

OSSERVAZIONI DIRETTE COMPORAMENTI SOCIALI

Data _____ Ora inizio osservazioni _____ Ora fine _____

Condizioni meteo _____

Eventi particolari _____

Comportamento	Orario inizio	Orario fine	Attore	Ricevente/i	note

Figura 20. Estratto della scheda pre impostata utilizzata per le osservazioni sociali

Sulla base dell'etogramma tipico della specie (Moehlman, 1998) e delle osservazioni in campo, sono stati presi in considerazione i seguenti comportamenti:

Comportamenti affiliativi:

- Prossimità e prossimità in movimento: gli animali rimangono volontariamente a meno di un metro di distanza l'uno dall'altro, sia fermi sia durante il movimento, per cui un asino segue l'altro. Solitamente si manifesta tra una coppia di asini ma talvolta può coinvolgerne anche 3 o 4.
- Allogrooming: un animale gratta una parte del corpo di un altro con gli incisivi, in genere reciprocato dall'altro e spesso con disposizione in parallelo con le teste rivolte in direzioni opposte (fig.21).



Figura 21. Allogrooming. Tratto da Moehlman, Applied Animal Behaviour Science (1998), 60:125-169

- Contatto: due asini entrano in contatto tra loro appoggiando delicatamente una parte del corpo, spesso la testa, al corpo di un altro.
- Annusare: un asino annusa una parte del corpo di un altro.
- Annusamento reciproco: due asini si annusano reciprocamente ponendosi in posizione muso-muso.

Comportamenti agonistici:

- **Displacement**: un asino compie movimenti atti a provocare lo spostamento di un altro.
- **Minaccia**: postura finalizzata ad intimidire un conspecifico caratterizzata da approccio frontale (fig.22) con orecchie tenute indietro, testa bassa e spesso bocca aperta come minaccia di morso oppure da un approccio posteriore (fig.23) con sollevamento di uno degli arti posteriori, anche con movimenti a scatto verso l'altro senza però arrivare al contatto.

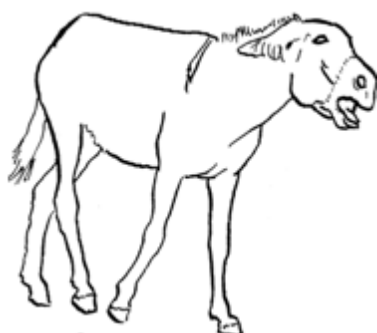


Figura 22. Esempio di postura di minaccia frontale. Tratto da Moehlman, Applied Animal Behaviour Science (1998), 60:125-169



Figura 23. Esempio di postura di minaccia posteriore. Tratto da Moehlman, Applied Animal Behaviour Science (1998), 60:125-169

- **Morso**: un asino si avvicina ad un altro con postura di minaccia e afferra con i denti la pelle di una qualunque parte del corpo dell'altro.
- **Calcio**: un asino colpisce un altro con uno o entrambi gli arti posteriori sollevandoli repentinamente dal suolo e dirigendoli con forza verso una qualsiasi parte del corpo dell'altro (fig.24).

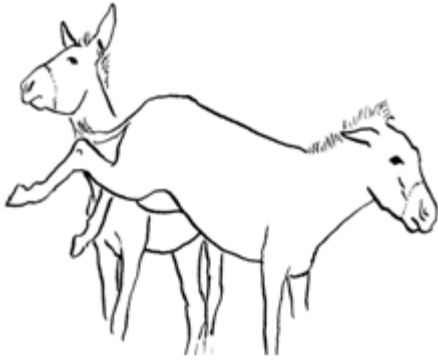


Figura 24. Calcio. Tratto da Moehlman, Applied Animal Behaviour Science (1998), 60:125-169

- Inseguimento: un asino ne insegue un altro a qualsiasi andatura con postura di minaccia.

Comportamenti sessuali:

- Montare: Un asino, maschio o femmina, sale con gli arti anteriori sulla groppa di una femmina (fig.25).

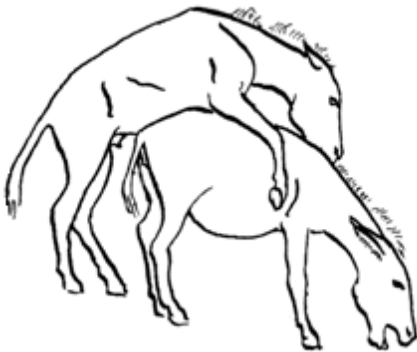


Figura 25. Un maschio monta una femmina in estro. Tratto da Moehlman, Applied Animal Behaviour Science (1998), 60:125-169

- Masticare a vuoto sincrono: due asine aprono e chiudono la bocca tramite movimenti verticali della mandibola con le labbra che coprono i denti, la testa abbassata e le orecchie tenute indietro, contemporaneamente e disposte in prossimità in modo tale da potersi vedere.

I comportamenti sessuali in generale non sono stati oggetto di rilevamento in questa fase poiché già oggetto di rilevamento durante il monitoraggio dei comportamenti estrali. In questa fase si è scelto di indagare solo due comportamenti particolari in cui lo stato estrale di un'asina induceva un comportamento in un conspecifico, e cioè

il montare oppure il masticare a vuoto sincrono. Infatti durante le osservazioni preliminari era stato notato che il comportamento di masticare di un'asina in estro in alcuni casi era accompagnato dallo stesso comportamento in un'altra, anche senza che quest'ultima fosse in estro, facendo quindi pensare ad un'induzione del comportamento.

Comunicazione olfattiva:

- Flehmen:postura caratterizzata da testa sollevata con naso proteso verso l'alto, collo teso e labbro superiore arricciato verso l'alto che lascia scoperti i denti e le gengive superiori.

Alcuni comportamenti, seppur parte dell'etogramma di specie, non sono stati considerati perché non rilevati nel corso delle osservazioni. Ne sono un esempio il gioco e il saluto, comportamenti che raramente trovano espressione nell'ambito di un gruppo di asini come quello osservato in cui non sono presenti puledri e in cui gli animali vivono sempre a stretto contatto e hanno già instaurato relazioni stabili.

Durante le osservazioni non sono mai stati presi in considerazione i comportamenti espressi dagli asini in risposta all'interferenza da parte di persone.

Eventuali fattori di disturbo che non hanno dato esito a comportamenti specificatamente correlati sono stati segnalati nella colonna delle note, senza interferire però con la registrazione dei comportamenti.

In una osservazione è avvenuto un episodio di disturbo particolarmente significativo per cui si è avuta un'interruzione dell'osservazione nei 5 minuti finali. Per questo motivo si è deciso di standardizzare i dati conteggiando solo quelli raccolti nei primi 55 minuti per tutte le osservazioni sia pre che post impianto.

Per l'elaborazione delle schede si è proceduto a riportare in un file Excel il totale dei comportamenti espressi da ogni asino nel corso di ogni osservazione dividendoli in categorie come mostrato in tabella 5.

CATEGORIA	COMPORAMENTI INCLUSI
Prossimità	Prossimità, prossimità in movimento
Agonistici	Posture di minaccia, displacement, morsi, calci
Riproduttivi	Montare, masticare a vuoto sincrono, flehmen
Altri	Contatto, annusare, annusamento reciproco
Allogrooming	Allogrooming

Tabella 5. Divisione dei comportamenti in categorie utilizzata per l'elaborazione delle schede delle osservazioni sociali

Tutti i comportamenti sono stati conteggiati sia per l'attore che per il ricevente, ad eccezione dei comportamenti agonistici e del flehmen, riportati solo per l'attore.

Per le categorie prossimità ed allogrooming è stata calcolata anche la durata complessiva espressa in secondi, trattandosi di stati più che di eventi. Laddove l'orario di inizio e di fine di un comportamento coincidessero (per una durata quindi inferiore al minuto) l'episodio è stato conteggiato nel numero degli episodi ma non nel calcolo della durata complessiva.

Inoltre per ogni osservazione è stato calcolato il tempo di fuoricampo iniziale, cioè il tempo intercorso tra l'inizio dell'osservazione e l'uscita di almeno due asini dalla capannina.

3.4.3 Osservazioni di situazioni di interazione

Sono stati realizzati dei filmati di situazioni, appositamente organizzate e standardizzate, in cui le asine avevano la possibilità di interagire con persone a loro sconosciute. Ogni video era costituito da due fasi, una prima in cui la persona stava ferma e le asine sceglievano liberamente se avvicinarsi, ed una seconda in cui la persona cercava di avvicinarle ed interagire con ognuna di loro. Questi filmati sono stati realizzati in tre giornate nel periodo pre-impianto ed altre tre giornate nel periodo post-impianto, con una cadenza ripartita in modo tale da coprire uniformemente l'intero periodo dello studio. In ogni giornata le asine hanno potuto interagire con due persone diverse.

Come volontari per la realizzazione dei video sono stati scelti due donne e due uomini, tutti sconosciuti alle asine. Questi quattro partecipanti erano tutti ragazzi giovani, i quali avevano dichiarato di non avere timori o difficoltà nell'interazione con gli animali. Sono stati impiegati un uomo ed una donna, sempre gli stessi, per la fase pre-impianto e gli altri due, sempre gli stessi, per la fase post-impianto (tabella 6).

	GIORNATA 1 PRE	GIORNATA 2 PRE	GIORNATA 3 PRE	GIORNATA 1 POST	GIORNATA 2 POST	GIORNATA 3 POST
SITUAZIONE 1	Anna	Anna	Anna	Elisa	Elisa	Elisa
SITUAZIONE 2	Matteo	Matteo	Matteo	Francesco	Francesco	Francesco

Tabella 6. Schema della realizzazione dei video e della suddivisione dei volontari durante le diverse fasi dello studio.

Ogni situazione di interazione consisteva nell'entrata di un volontario nel recinto con una sedia con cui si posizionava al centro dello stesso. La persona rimaneva seduta per 15 minuti interagendo con gli asini qualora loro si avvicinassero od eventualmente utilizzando uno smartphone in loro assenza.

Trascorsi i 15 minuti, il volontario si alzava e tentava di avvicinarsi ad ognuna delle 8 asine oggetto dello studio facendo annusare il palmo della mano e, qualora si mostrassero ben disposte, facendo loro una carezza sul collo.

Potevano avvenire poi altre interazioni se l'asina si rivelava disponibile e ricercava ulteriori contatti.

Se le asine si trovavano nella capannina la persona provava ad affacciarsi per richiamare la loro attenzione, senza però entrare.

L'inquadratura è stata il più possibile fissa sulla persona presente nel recinto e l'operatore con la videocamera, sempre il medesimo, rimaneva posto vicino alla staccionata per i primi 15 minuti mentre seguiva la persona oggetto del video nella fase successiva.

A causa delle esigenze logistiche dei volontari non è stato possibile standardizzare l'orario di svolgimento degli eventi che comunque sono stati realizzati sempre in una fascia oraria compresa tra la tarda mattinata e il primo pomeriggio.

Durante la realizzazione del filmato con un volontario, l'altro rimaneva a distanza dal recinto degli asini evitando così di farsi vedere ed interagire con loro al di fuori della situazione programmata.

Alcune condizioni, in quanto contesto di campo, non hanno potuto essere standardizzate, come ad esempio la presenza in alcune occasioni di altre persone nelle vicinanze durante la realizzazione dei filmati.

Per quanto riguarda la somministrazione del cibo questa avveniva prima della realizzazione dei video che quindi sono stati registrati, tranne in una sola giornata, in presenza di alimento a libera disposizione degli animali. I video delle interazioni avvenute in assenza della razione di alimento è stato escluso dai risultati durante la fase di elaborazione dei dati a causa della significativa diversità rispetto agli altri. Per questo motivo i risultati del post impianto sono stati ottenuti dalla media dei dati di due filmati invece che di tre.

Per l'analisi dei filmati questi sono stati divisi in due parti, la prima rappresentata dai primi 15 minuti in cui la persona restava seduta e la seconda rappresentata dalla ricerca dell'interazione da parte della persona.

Per quanto riguarda la prima parte sono stati inseriti in un file Excel tutti gli episodi in cui un asino si avvicinava alla persona rimanendo nel raggio di 2 metri da essa. Per ogni episodio sono stati riportati attore, durata, latenza, tempo effettivo di interazione, tempo di sovrapposizione (cioè di presenza contemporanea di altri asini), intensità di comportamenti affiliativi verso la persona ed agonistici verso la persona e verso i conspecifici. I comportamenti agonistici verso i conspecifici sono stati raccolti solo a fini descrittivi e non sono stati oggetto di analisi poiché gli eventi di questo tipo sono stati

piuttosto esigui e poiché, data la natura di queste osservazioni limitate allo spazio dell'inquadratura, non è possibile escludere che gli animali abbiano avuto tra loro altri comportamenti agonistici al di fuori del campo di osservazione, potendo avere quindi una visione solo parziale di questo aspetto.

L'intensità dei comportamenti affiliativi ed agonistici è stata classificata come indicato in tabella 7 e 8.

INTENSITÀ COMPORAMENTI AFFILIATIVI	LEGENDA
1	Si avvicina
2	Contatto
3	Richiesta/ricerca contatto
4	Contatto intenso e prolungato, continuo interesse

Tabella 7. Classificazione utilizzata per l'attribuzione di un punteggio all'intensità dei comportamenti affiliativi verso la persona.

INTENSITÀ COMPORAMENTI AGONISTICI	LEGENDA
0	Nessun comportamento agonistico
1	Orecchie indietro, fa spostare
2	Postura di minaccia accentuata
3	Calcio/morso
4	Inseguimento

Tabella 8. Classificazione utilizzata per l'attribuzione di un punteggio all'intensità dei comportamenti agonistici verso la persona.

Il calcolo del tempo effettivo di interazione si è reso necessario in quanto spesso gli asini stavano entro il raggio di 2 metri dalla persona ma senza dedicarle attenzione, incuriositi dalla sedia che spesso è stata oggetto di prolungata attenzione. Quando possibile è stato calcolato il tempo effettivo di interazione, mentre quando il passaggio di attenzione tra la sedia e la persona era continuo è stato considerato come tempo di interazione la metà della durata dell'episodio.

Inoltre è stato attribuito un punteggio al livello di disturbo per ogni video (tabella 9).

LIVELLO DI DISTURBO	LEGENDA
0	Niente da rilevare
1	Persone nelle vicinanze, attività quotidiane
2	Persone al recinto
3	Interazioni con persone esterne

Tabella 9. Classificazione utilizzata per l'attribuzione di un punteggio al livello di disturbo

Per quanto riguarda invece la seconda parte del video in cui la persona cercava di interagire con ognuna delle 8 asine, il risultato è stato riassunto con l'attribuzione di un punteggio secondo i parametri indicati in tabella 10.

PUNTEGGIO SALUTO FINALE	LEGENDA
0	Asina non raggiunta (capannina)
1	Asina raggiunta ma nessuna interazione (es. mangiatoia)
2	La persona riesce a farsi annusare e fare una carezza ma l'asina si allontana subito/è disinteressata
3	L'asina si avvicina spontaneamente, annusa, si lascia accarezzare ma si mostra disinteressata/si allontana subito
4	La persona si avvicina, si fa annusare e accarezza l'asina che si dimostra interessata al contatto
5	L'asina si avvicina spontaneamente e accetta volentieri il contatto

Tabella 10. Classificazione utilizzata per l'attribuzione di un punteggio al saluto finale.

3.4.4 Questionari per gli operatori

Al termine del periodo pre-impianto e di quello post-impianto è stato sottoposto ad un operatore che lavora quotidianamente con le asine un questionario per ciascuna di esse. Nel questionario si richiede una valutazione dei comportamenti espressi dall'asina nell'arco del periodo in oggetto (vedi allegato 2).

Di seguito è riportata una tabella riassuntiva dei tempi e delle modalità di svolgimento dello studio etologico (tabella 11). Questo ha una durata complessiva di 45 giorni, suddivisi in una fase pre-impianto e una fase post-impianto.

T-4	Osservazione sociale del gruppo di asini, realizzazione di video di 2 situazioni di interazione	PRE
T-3	Osservazione sociale del gruppo di asini, realizzazione di video di 2 situazioni di interazione	
T-2	Osservazione sociale del gruppo di asini, realizzazione di video di 2 situazioni di interazione	
T-1	Osservazione sociale del gruppo di asini, somministrazione di un questionario agli operatori del centro	
T0	IMPIANTO	
T10	Osservazione sociale del gruppo di asini, realizzazione di video di 2 situazioni di interazione	POST
T20	Osservazione sociale del gruppo di asini, realizzazione di video di 2 situazioni di interazione	
T30	Osservazione sociale del gruppo di asini, realizzazione di video di 2 situazioni di interazione	
T40	Osservazione sociale del gruppo di asini, somministrazione di un questionario agli operatori del centro	
	FINE STUDIO	

Tabella 11. Schema riassuntivo dello studio etologico

3.5 Analisi dei risultati

L'analisi statistica dei valori ottenuti dai dosaggi ormonali è stata effettuata tramite test di Friedman, test non parametrico utilizzato per confronti multipli di campioni dipendenti. Con questo test sono state messe a confronto le concentrazioni degli ormoni nei vari giorni dei prelievi per indagare la presenza o meno di differenze significative.

L'analisi statistica dei dati ottenuti dalle osservazioni etologiche è stata invece effettuata mediante test di Wilcoxon, test non parametrico per dati appaiati che confronta due gruppi di dati non indipendenti. Infatti è stato effettuato un confronto tra i dati del pre e del post impianto che si riferiscono sempre alle medesime asine.

Nel caso delle osservazioni sociali è stato conteggiato per ognuna il numero di episodi di comportamenti delle categorie prossimità, agonistici, riproduttivi, altri e allogrooming e la durata in secondi dei comportamenti di prossimità e di allogrooming per ciascun asino. È stata poi fatta una media tra i valori di ogni categoria ottenuti da ogni asino nelle osservazioni pre e tra quelli ottenuti nelle osservazioni del post. Infine i valori medi del pre sono stati confrontati a quelli del post tramite test di Wilcoxon.

Per quanto riguarda invece i filmati delle interazioni, in seguito alla trasposizione Excel di tutti gli episodi di interazione con le relative caratteristiche, come spiegato nel capitolo 3.4.3, si è proceduto a fare una media tra i valori ottenuti da ogni asina per ogni aspetto (Numero di episodi, latenza, durata, tempo di interazione, tempo di sovrapposizione, comportamenti affiliativi, comportamenti agonistici e punteggio del saluto finale) nei video del periodo pre impianto e poi allo stesso modo per il periodo post impianto, differenziando in entrambi i casi la media ottenuta con il volontario uomo e quella ottenuta con la donna, per un totale di quattro medie finali per ogni aspetto considerato per ogni asina. I valori medi del pre impianto sono stati quindi messi a confronto con quelli del post.

4. RISULTATI e DISCUSSIONE

4.1 *Inibizione dell'estro*

La prima parte dei risultati esposti riguarda il monitoraggio riproduttivo effettuato con il fine di capire se gli impianti di deslorelin siano o meno in grado di inibire l'attività estrale nell'asina. Questo monitoraggio si compone di:

- Rilevazione dei comportamenti estrali
- Ecografie trans rettali
- Dosaggi ormonali

4.1.1 *Manifestazioni estrali*

In seguito all'impianto di deslorelin (T0) sono stati rilevati comportamenti estrali a partire dal momento T9. Tali comportamenti hanno interessato 4 asine, mentre nelle restanti 4 non sono stati osservati comportamenti riconducibili all'estro per tutta la durata dello studio (tabella 12). Nel prospetto seguente sono indicati i tempi e le tipologie di comportamenti espressi.

Solo a fini descrittivi sono talora riportate anche osservazioni di un comportamento estrale non accompagnato da altri comportamenti indicativi di estro. Tali manifestazioni non soddisfano il criterio stabilito di almeno due comportamenti ripetuti più volte nella stessa giornata di osservazione e non sono quindi considerate indicative di estro.

1. **GIGLIOLA:** nessun estro rilevato
2. **CLEOPATRA:** nessun estro rilevato
3. **MICHELA:**
 - T9 → mastica a vuoto, si lascia montare
 - T 10 → mastica a vuoto, flehmen
 - T 12 → mastica a vuoto, flehmen, urina di frequente
4. **ROSSA:**
 - T 11 → si lascia montare, mastica a vuoto e urina di frequente
 - T 12 → mastica a vuoto, flehmen, urina di frequente, si lascia montare

- T 38 → mastica a vuoto, si lascia montare

- T 40 → mastica a vuoto

5. **EVA:**

- T 16 → mastica a vuoto

- T 20 → si lascia montare

- T 40 → mastica a vuoto, si lascia montare

6. **PENELOPE:** nessun estro rilevato

7. **KEKA:** nessun estro rilevato

8. **GINEVRA:**

- T 30 → si lascia montare, mastica a vuoto, lampeggiamento del clitoride

- T 38 → mastica a vuoto, lampeggiamento del clitoride

	T9	T10	T11	T12	T16	T20	T30	T38	T40
GIGLIOLA									
CLEOPATRA									
MICHELA									
ROSSA									X
EVA					X	X			
PENELOPE									
KEKA									
GINEVRA									

Tabella 12. Schema riassuntivo dei comportamenti estrali rilevati. Le caselle rosa indicano la presenza di almeno due comportamenti estrali manifestati ripetutamente nella stessa giornata. La X indica la presenza di un solo tipo di comportamento estrale osservato.

Inoltre in un'occasione è stata osservata un'asina non in estro (Penelope), masticare a vuoto contemporaneamente e in prossimità di un'asina in estro (Michela). In tale occasione le asine erano posizionate con le teste vicine, con la possibilità quindi di vedersi, manifestando un'apparente induzione del comportamento nell'asina non in estro. Un'altra osservazione di masticazione a vuoto sincrona ha interessato Rossa ed Eva al momento T40.

4.1.2 Reperti ecografici

Le ecografie, eseguite su tutti gli animali durante la fase del post impianto, hanno permesso il monitoraggio del numero e delle dimensioni dei follicoli, della presenza del corpo luteo e di eventuale edema a livello uterino. Per quanto riguarda l'attività ovarica, 2 asine hanno mostrato completa inattività con permanenza di multiple small follicles (MSF) per tutta la durata dello studio; le asine restanti hanno mostrato almeno una volta la presenza di follicoli di almeno 20 mm, fino ad un diametro massimo di 25 mm. In tutti gli animali non è mai stato rilevato edema uterino. Il corpo luteo in due casi (Cleopatra e Keka) è rimasto sempre visibile ecograficamente, in altre 5 asine è stato visibile fino al momento T16 e non più rilevato da T21 in poi, in una sola asina (Michela) il corpo luteo è stato visibile fino a T16, non rilevato a T21 e nuovamente visibile a T28 e T35. In tabella 13 sono riportati nel dettaglio i risultati appena descritti.

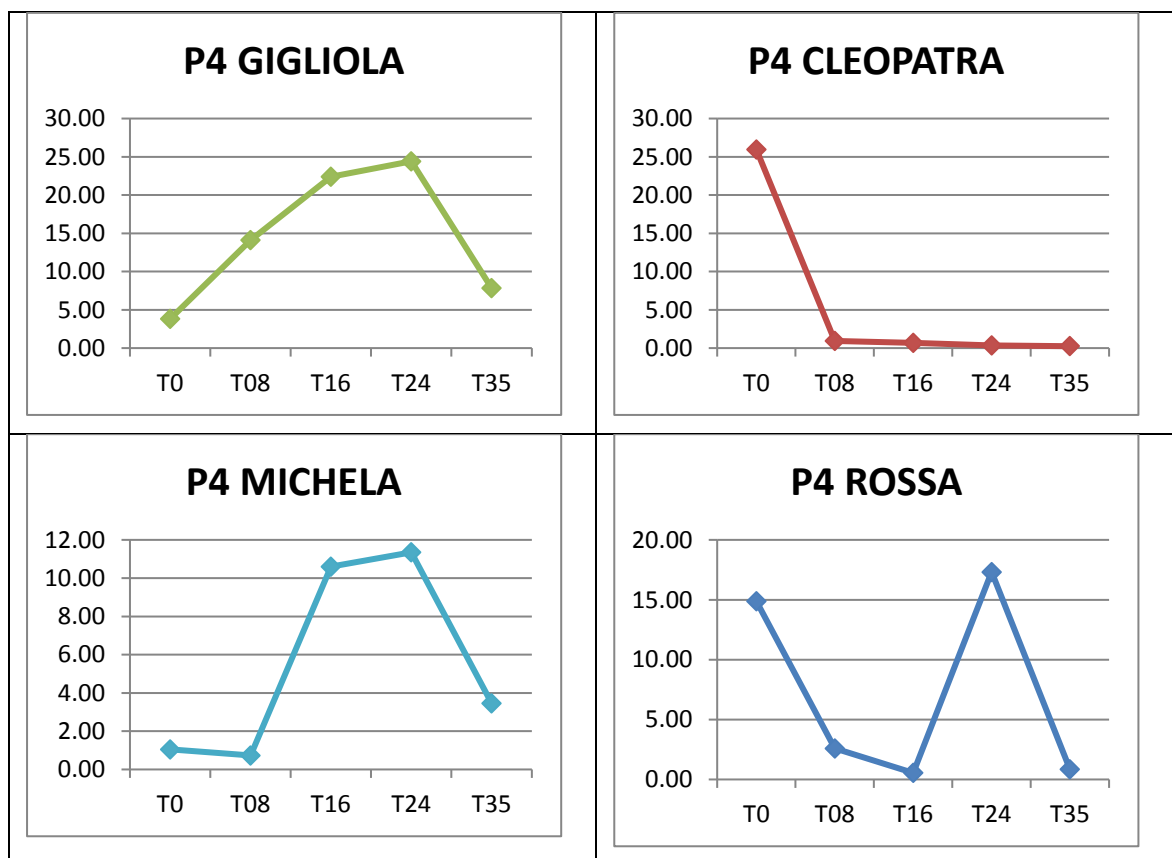
	T1	T8	T16	T21	T28	T35
GINEVRA	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	20X3,0	MSF,0	MSF,0
GIGLIOLA	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	25X2,0	MSF,0	MSF,0
EVA	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,0	20X2,0	25X4,0
ROSSA	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,0	25X3,0	25X3,0
MICHELA	MSF,CL,0	25X3,CL,0	25X4,CL,0	25X3,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0
KEKA	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0
PENELOPE	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	25X6,0	22X3,0	25X6,0
CLEOPATRA	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0	MSF,CL,0

Tabella 13. Schema dei reperti ecografici rilevati. Verde: situazione ovarica, MSF= multiple small follicles /diametro follicoli in mm X n° follicoli di dimensioni simili. Rosso: CL= corpo luteo visibile. Nero: punteggio edema endometriale (0=assente)

4.1.3 Dosaggi ormonali

Su tutti i campioni di sangue prelevati è stato eseguito il dosaggio di progesterone, estrogeni e DHEA. Nelle pagine seguenti sono illustrati nel dettaglio gli esiti di tali dosaggi.

Nelle tabelle 14, 16 e 18 sono riportati sotto forma di grafico i valori dell'ormone ottenuti per ogni asina nei 5 prelievi, effettuati a T0, T8, T16, T24 e T35. Tali valori sono poi riassunti con la media dei valori di tutte le asine nei vari momenti (tabelle 15, 17 e 19).



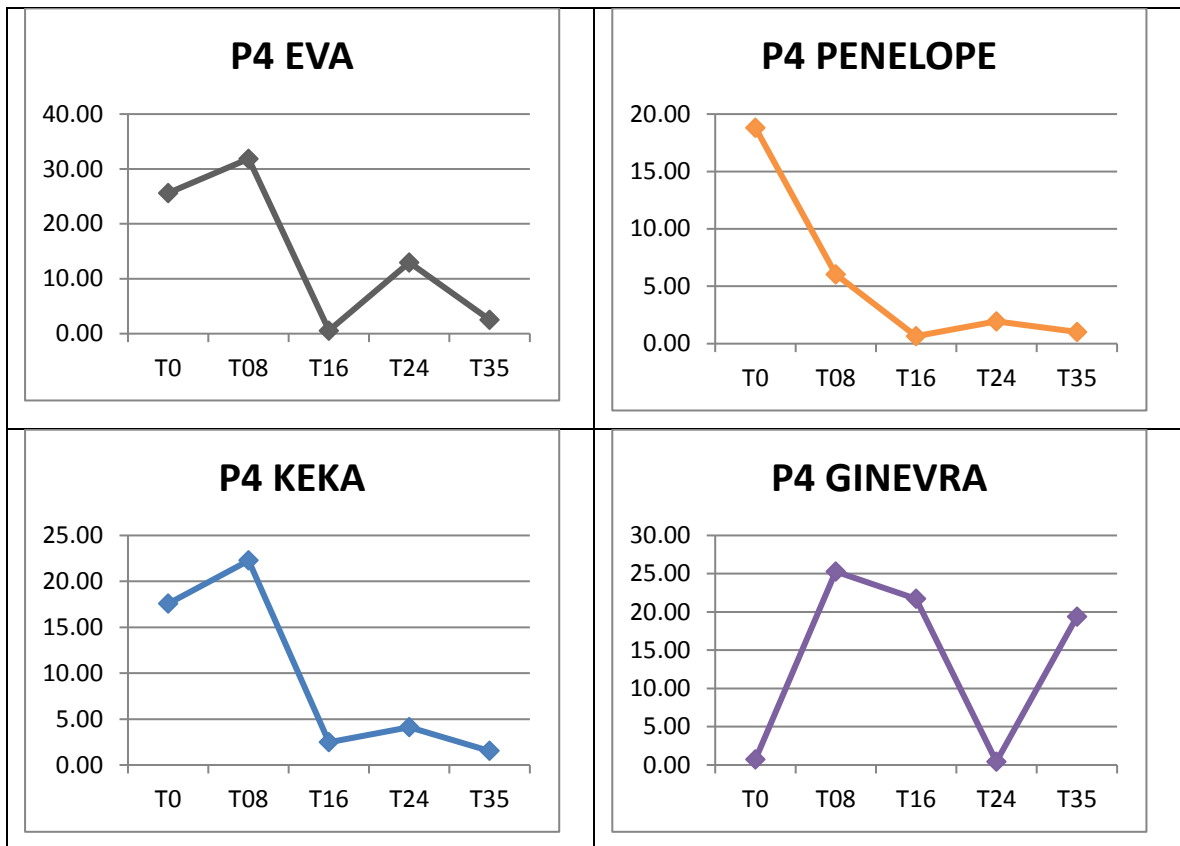


Tabella 14. Grafici dei valori di progesterone a T0,T8,T16,T24 e T35 in ogni asina. ng/ml

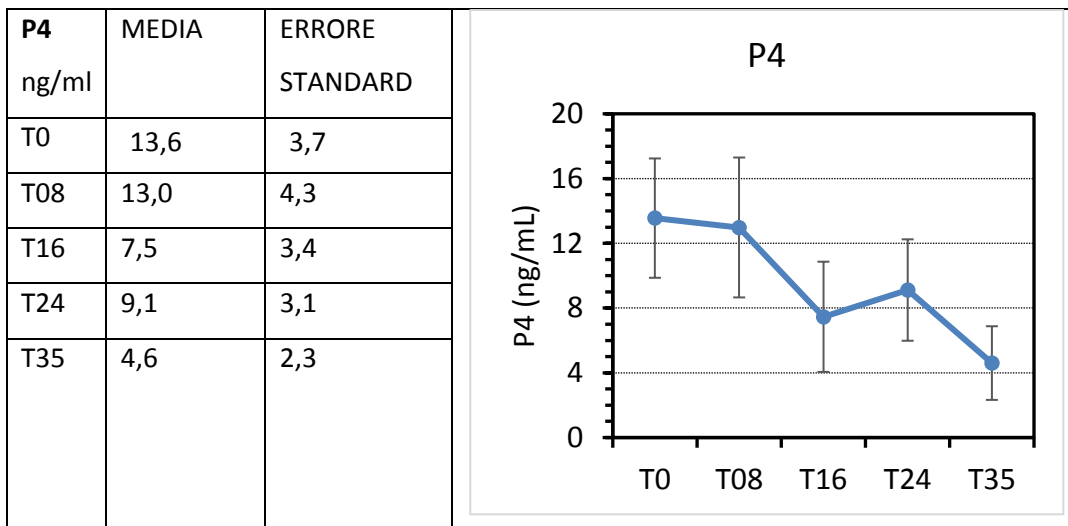


Tabella 15. Media e deviazione standard dei valori di progesterone delle otto asine.

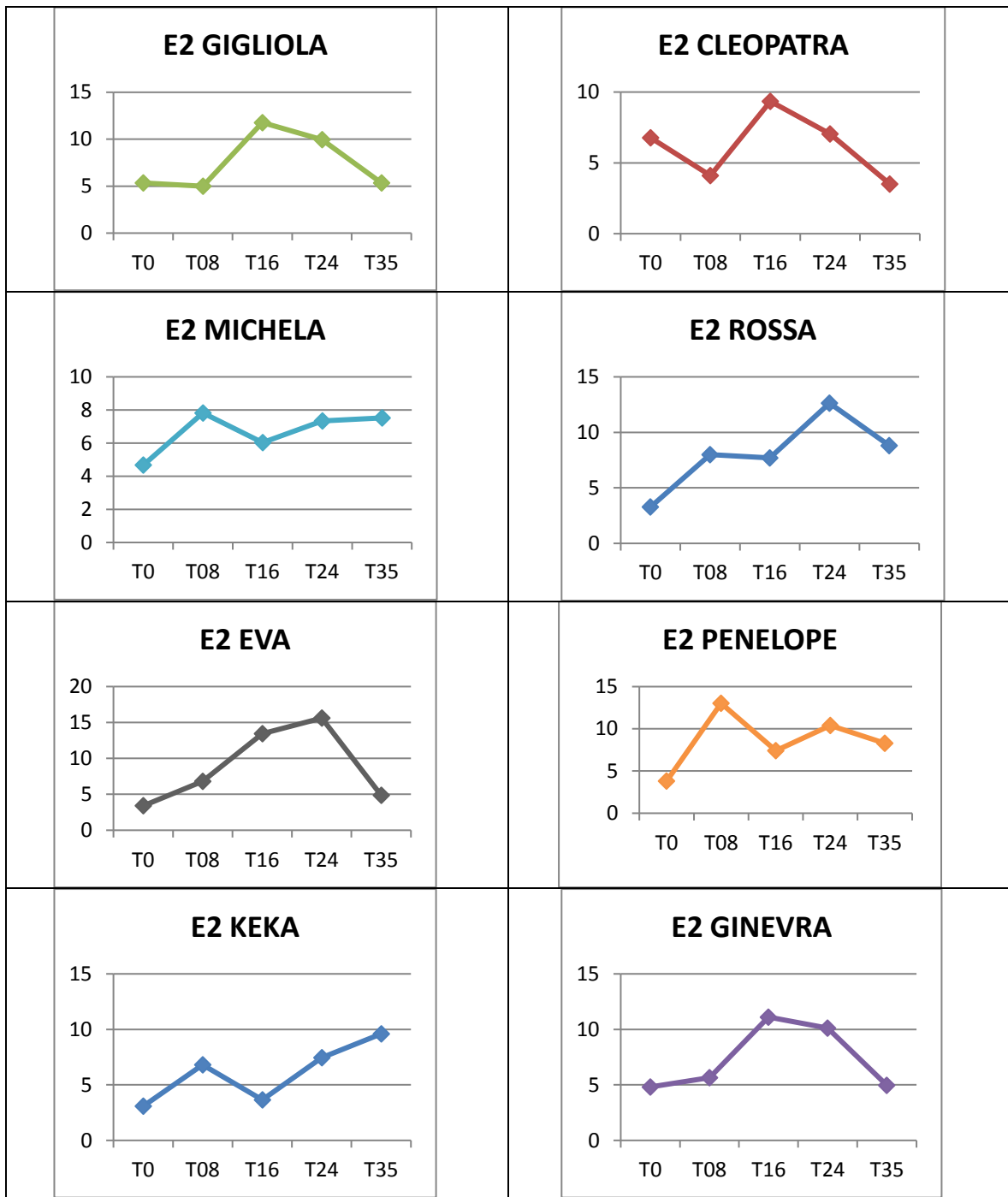


Tabella 16. Grafici dei valori degli estrogeni a T0,T8,T16,T24 e T35 in ogni asina. pg/ml

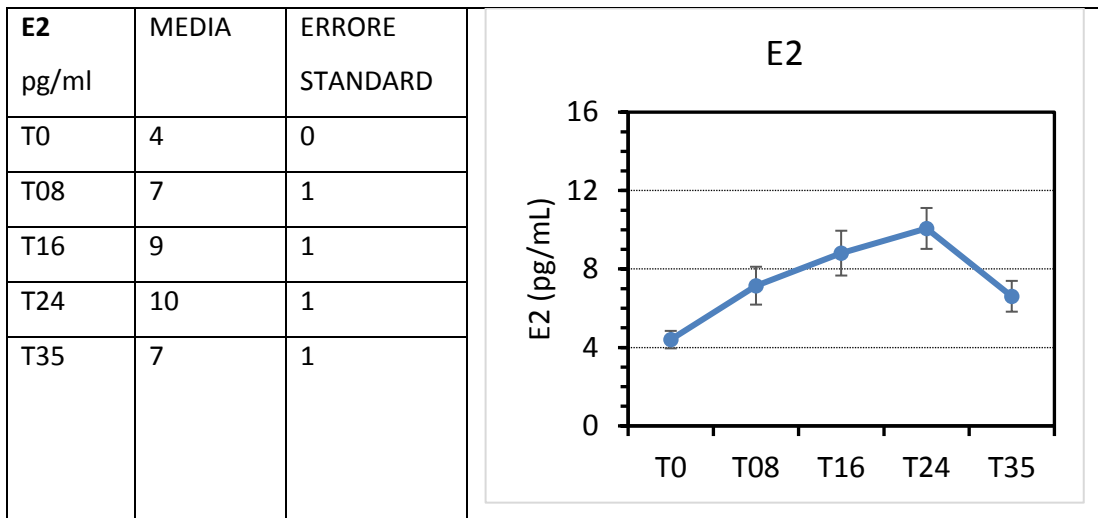
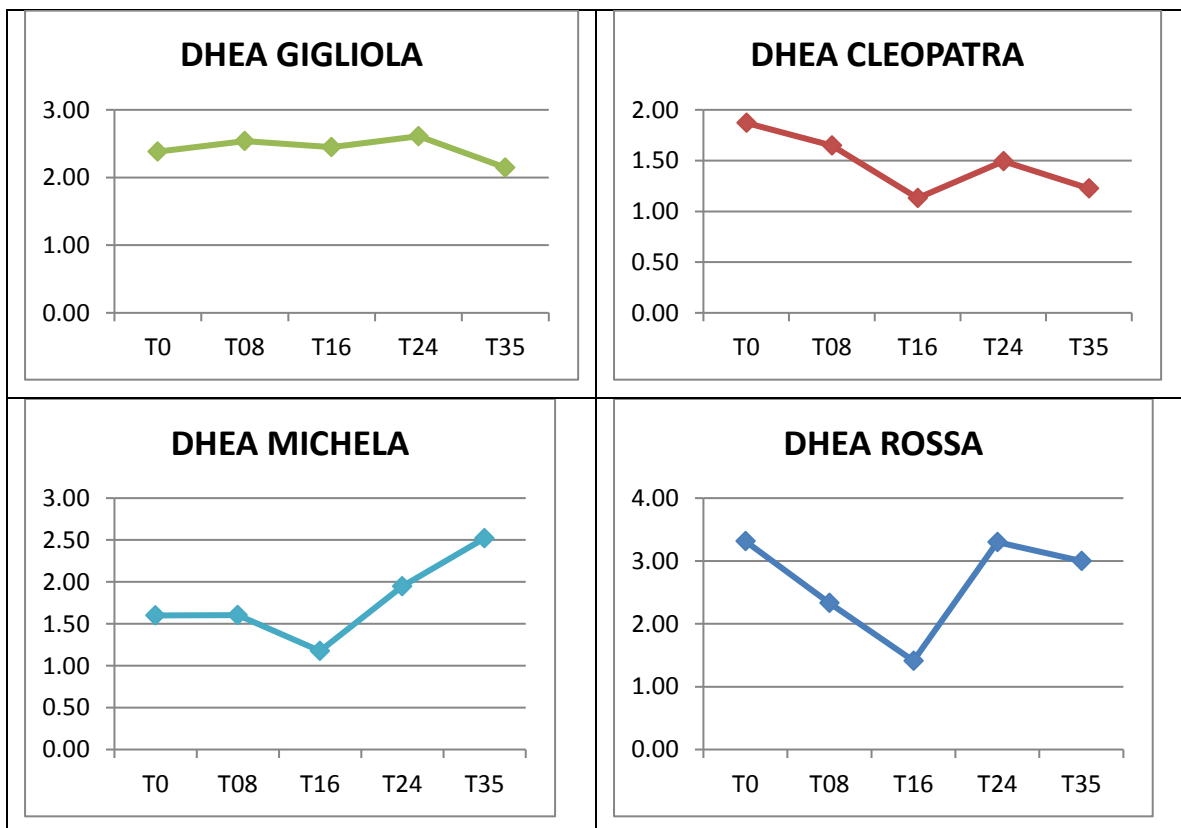


Tabella 17. Media e deviazione standard dei valori di estrogeni delle otto asine



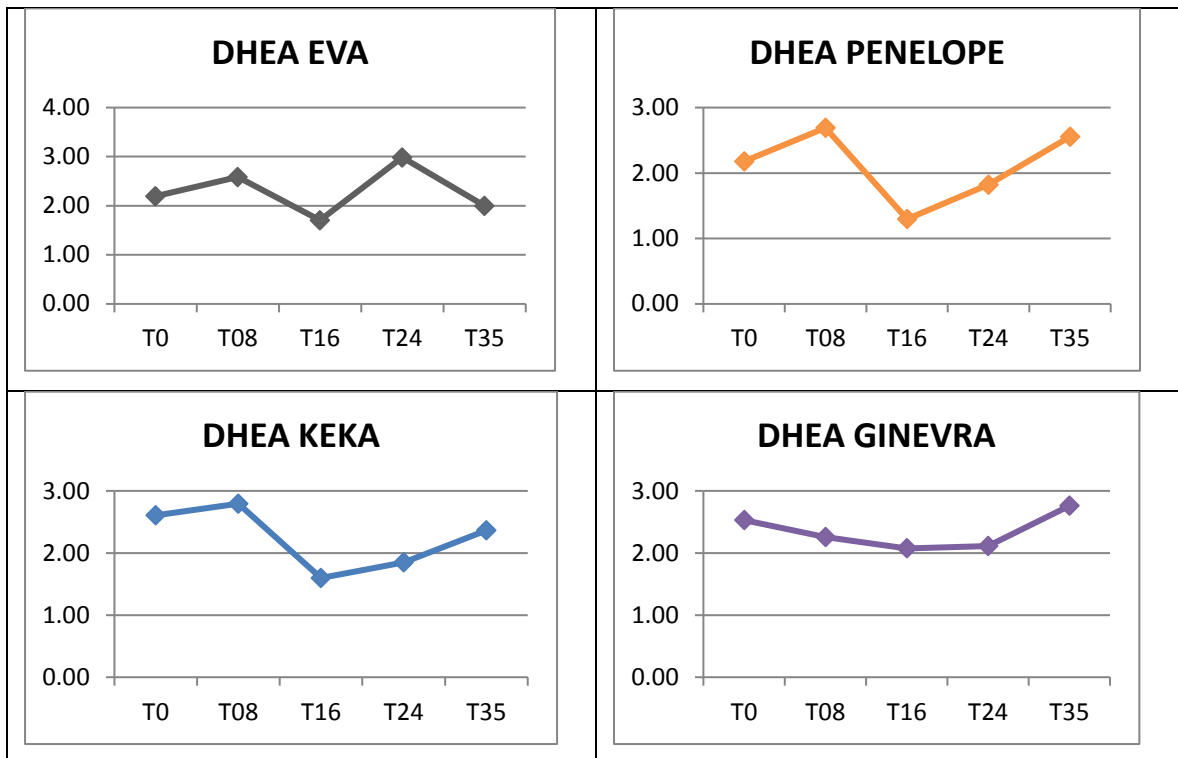


Tabella 18. Grafici dei valori del DHEA a T0,T8,T16,T24,T35 in ogni asina. ng/ml

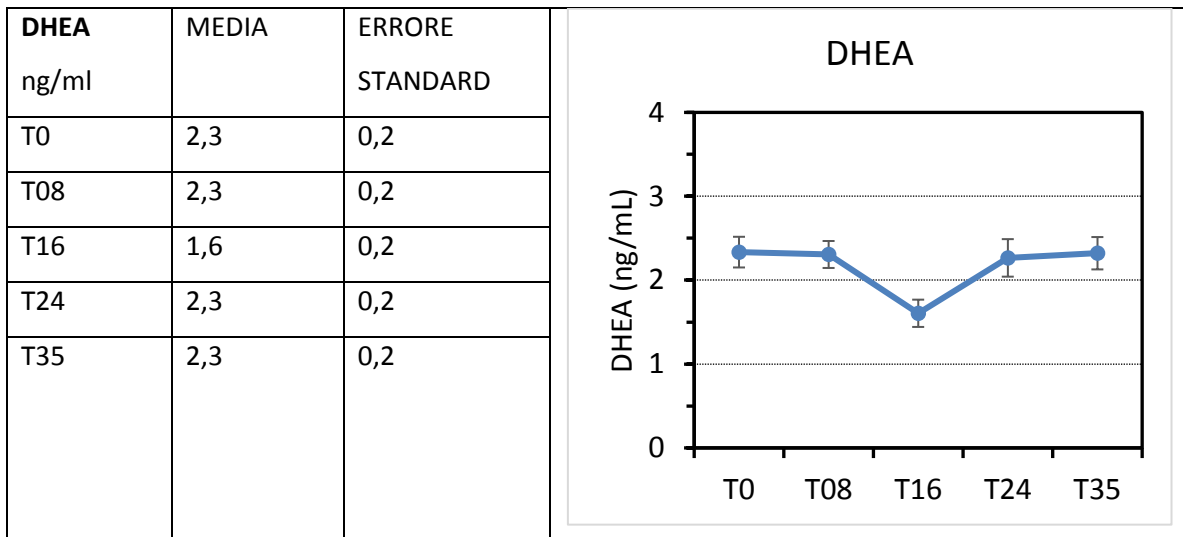


Tabella 19. Media e deviazione standard dei valori di DHEA delle otto asine.

I valori ottenuti dai dosaggi ormonali sono stati analizzati tramite test di Friedman.

La differenza tra i valori della concentrazione di P4 nei vari giorni non risulta statisticamente significativa ($P > 0,05$) mentre si è ottenuta una significatività per quanto riguarda i valori di

- E2 (Chi Sqr.=12,45; $P = 0,014$; Coeff. of Concordance= 0,389)
- DHEA (Chi Sqr.=12,90; $P = 0,011$; Coeff. of Concordance= 0,403)

DHEA ed E2 hanno quindi subito delle variazioni significative in relazione al prelievo mentre il P4 non ha mostrato un andamento riferibile al tempo.

I seguenti grafici (fig. 26 e 27) mostrano l'andamento nel tempo di estrogeni e DHEA, i range di valori riportati nei vari prelievi e le loro mediane.

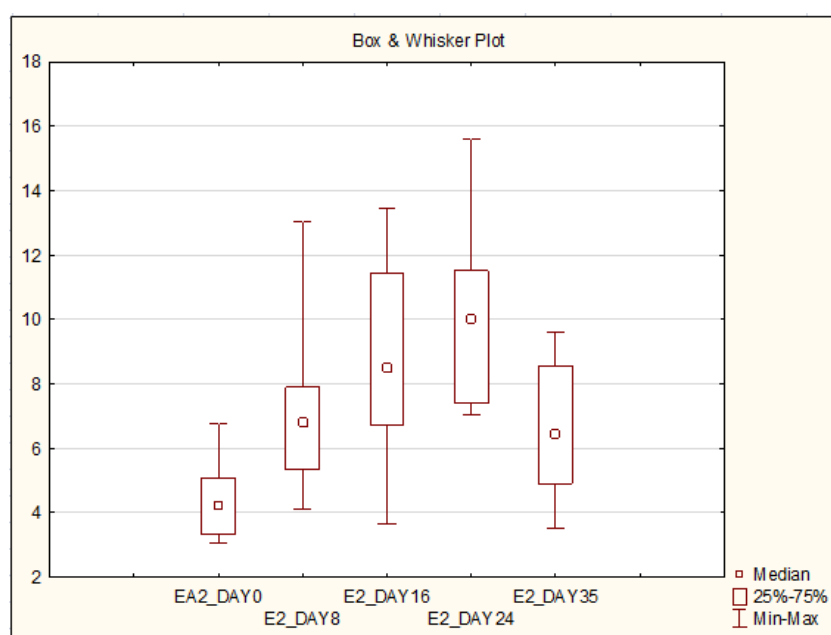


Figura 26. Andamento degli estrogeni, range dei valori delle otto asine nei vari momenti e relative mediane

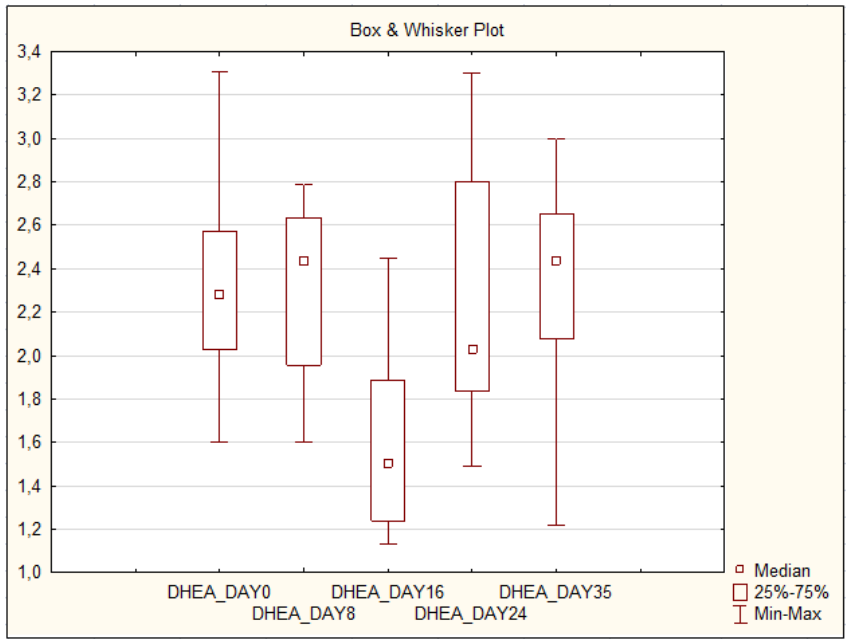


Figura 27. Andamento del DHEA, range dei valori delle otto asine nei vari momenti e relative mediane.

4.1.4 Riassunto e discussione degli esiti del monitoraggio riproduttivo

In tabella 20 è riportata una panoramica completa degli esiti ecografici, ormonali e delle manifestazioni estrali di ogni asina.

Asine	T0 IMPIANTO	T1	T8	T9	T11	T12	T16	T20	T21	T24	T28	T30	T35	T38	T40
GIGLIOLA		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		25x2 Edema 0		MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		
	Dhea 2,38 P4 3,82 E2 5,35		Dhea 2,54 P4 14,10 E2 5,00				Dhea 2,45 P4 22,41 E2 11,77			Dhea 2,61 P4 24,41 E2 9,96			Dhea 2,15 P4 7,84 E2 5,35		
CLEOPATRA		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		
	Dhea 1,87 P4 25,96 E2 6,77		Dhea 1,65 P4 0,96 E2 4,10				Dhea 1,13 P4 0,70 E2 9,34			Dhea 1,49 P4 0,36 E2 7,04			Dhea 1,22 P4 <0,25 E2 3,50		
MICHELA		MSF Cl. Edema 0	25x3 Cl. Edema 0				25x4 Cl. Edema 0		25x3 Edema 0		MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		
	Dhea 1,60 P4 1,05 E2 4,67		Dhea 1,60 P4 0,73 E2 7,82				Dhea 1,18 P4 10,60 E2 6,03			Dhea 1,95 P4 11,35 E2 7,34			Dhea 2,52 P4 3,45 E2 7,52		
ROSSA		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		MSF Edema 0		25x3 Edema 0		25x3 Edema 0		
	Dhea 3,31 P4 14,88 E2 3,28		Dhea 2,33 P4 2,59 E2 7,98				Dhea 1,41 P4 0,55 E2 7,70			Dhea 3,30 P4 17,32 E2 12,63			Dhea 3,00 P4 0,86 E2 8,81		
EVA		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		MSF Edema 0		20x2 Edema 0		25x4		
	Dhea 2,19 P4 25,63 E2 3,40		Dhea 2,58 P4 31,86 E2 6,82				Dhea 1,70 P4 0,58 E2 13,43			Dhea 2,99 P4 12,97 E2 15,61			Dhea 2,00 P4 2,50 E2 4,86		
PENELOPE		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		25x6 Edema 0		22x3 Edema 0		25x6 Edema 0		
	Dhea 2,18 P4 18,81 E2 3,81		Dhea 2,69 P4 6,04 E2 13,03				Dhea 1,30 P4 0,65 E2 7,41			Dhea 1,82 P4 1,96 E2 10,40			Dhea 2,55 P4 1,01 E2 8,29		
KEKA		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		MSF Cl. Edema 0		
	Dhea 2,61 P4 17,57 E2 3,08		Dhea 2,79 P4 22,26 E2 6,81				Dhea 1,60 P4 2,46 E2 3,66			Dhea 1,85 P4 4,10 E2 7,44			Dhea 2,36 P4 1,52 E2 9,60		
GINEVRA		MSF Cl. Edema 0	MSF Cl. Edema 0				MSF Cl. Edema 0		20x3 Edema 0		MSF Edema 0		MSF Edema 0		
	Dhea 2,53 P4 0,73 E2 4,81		Dhea 2,26 P4 25,28 E2 5,66				Dhea 2,07 P4 21,72 E2 11,11			Dhea 2,11 P4 0,43 E2 10,11			Dhea 2,76 P4 19,37 E2 4,96		

LEGENDA:


 = Manifestazioni estrali DHEA: ng/ml P4: ng/ml E2: pg/ml Cl.: corpo luteo visibile MSF: multiple small follicles
Follicoli di medie/grandi dimensioni indicati con: diametro in mm X numero dei follicoli con diametro simile

Tabella 20. Tabella riassuntiva degli esiti del monitoraggio riproduttivo

Tale studio clinico si è svolto su asine di proprietà regolarmente impiegate in IAA. Ciò ha condizionato il monitoraggio riproduttivo sia sulla scelta delle tempistiche che sul numero dei rilievi post impianto. Infatti il proprietario non ha concesso di intensificare i monitoraggi nel timore di condizionare il benessere degli animali. Inoltre le tempistiche hanno dovuto in un'occasione essere riadattate in base alla disponibilità degli operatori del centro.

In base agli esiti riassunti in tabella 20 è ora possibile fare delle considerazioni su quanto emerso dal nostro studio. Sebbene il protocollo sia iniziato con una sincronizzazione degli estri con prostaglandine per la quale ci si sarebbe aspettati di trovare tutti gli animali allineati in una fase estrale al momento dell'impianto, in realtà ciò non è avvenuto. Infatti si è osservata in tutte le asine un'inaspettata presenza del corpo luteo già al momento T1, 5 giorni dopo la seconda prostaglandina e un giorno dopo l'impianto, e allo stesso tempo una serie di risposte individuali dal punto di vista ormonale e una quasi totale assenza di segni estrali. Solo un'asina (Ginevra) sembra aver risposto alla sincronizzazione manifestando comportamenti estrali al quarto giorno dopo la seconda prostaglandina e presentando livelli di P4 <1 ng/ml compatibili con una fase estrale al momento dell'impianto. Nelle altre asine la totale assenza di segni estrali sia nei 4 giorni precedenti all'impianto che nei giorni successivi e i livelli di progesterone più o meno elevati al momento dell'impianto (superiori ai 2 ng/ml in 6 asine su 8) fanno pensare ad una mancata risposta al protocollo di sincronizzazione effettuato. A tal proposito è difficile trovare delle spiegazioni soddisfacenti in quanto la tipologia e la dose di prostaglandine utilizzate risultano adeguate rispetto ai dati a nostra disposizione. Da foglietto illustrativo (CEVA VETEM, 2012) il Gabbrostim® è indicato per l'uso negli equidi ad una dose di 1,5 ml/capo pari a 3 mg, quindi inferiore alla dose utilizzata. Inoltre in letteratura esiste un altro lavoro che riporta l'utilizzo dello stesso prodotto alla dose di 3 mg per indurre luteolisi nell'asina (Camillo et al., 2014). Il problema potrebbe invece aver riguardato la distanza intercorsa tra le due iniezioni (12 giorni) e il periodo di insensibilità del corpo luteo alle prostaglandine, riportato da foglietto illustrativo per gli equidi fino al 5° giorno post ovulazione (CEVA VETEM, 2012). Sempre secondo le indicazioni del prodotto, in seguito alla somministrazione di Gabbrostim® l'ovulazione è attesa dopo 6-8 giorni (CEVA VETEM, 2012). Tempi ancor più lunghi sono riportati in uno

studio su due diversi protocolli di sincronizzazione degli estri nelle asine, nel quale il tempo medio intercorso tra il secondo trattamento con PGF2 α e l'ovulazione è stato di circa 10 giorni (Blanchard et al., 1999). Se quindi la prima iniezione avesse funzionato inducendo un'ovulazione dopo 8 giorni, vorrebbe dire che la seconda iniezione sarebbe stata fatta in presenza di un corpo luteo di 4 giorni, probabilmente insensibile alla prostaglandina. Anche quest'ultimo punto però rimane dibattuto in quanto esistono studi che dimostrano l'efficacia dell'uso della PGF2 α per l'induzione della luteolisi nell'asina già al 3° giorno post ovulazione (Carluccio et al., 2006; Carluccio et al., 2008). Si può ipotizzare che, grazie alla maggior durata del diestro che caratterizza l'asina, sarebbe stato possibile evitare tali problematiche e aumentare le probabilità di successo effettuando le due iniezioni a distanza di 16 giorni come riportato nello studio di Blanchard et al. del 1999.

In definitiva è probabile che gli impianti di deslorelin siano stati inoculati nella maggioranza delle asine in fase diestrale piuttosto che in fase estrale come era stato previsto. Il deslorelin, principio attivo solitamente utilizzato negli equidi per indurre l'ovulazione, nella cavalla somministrato in presenza di un follicolo di almeno 30 mm, induce l'ovulazione entro 48 ore (Jöchle e Trigg, 1994). In questo caso è lecito pensare che sia venuta a mancare l'iniziale ovulazione indotta dal GnRH visti gli alti livelli di progesterone e la probabile assenza di follicoli di almeno 30 mm, dato che già al momento T1 tutte le asine mostravano solo follicoli multipli di piccole dimensioni, corpo luteo e assenza di edema.

Questo aspetto non è comunque di grande importanza ai fini di questo studio in cui si voleva invece ottenere l'inibizione del ciclo estrale. Da quanto si può vedere dagli esiti dei 40 giorni di monitoraggio post impianto nessuna delle asine ha mai mostrato un quadro clinico riferibile all'estro. L'assenza di edema endometriale in tutte le ecografie è il primo fattore che permette di escludere clinicamente lo stato estrale. Infatti, oltre ad essere clinicamente evidente ed ampiamente riportato nella cavalla, è riportato anche da uno studio nell'asina di Taberner et al. del 2008 che durante l'estro l'utero appare ecograficamente come una serie di spazi anecogeni regolari e con disposizione radiale, segno di edema della parete endometriale. L'assenza di edema è inoltre spiegata dalle basse concentrazioni di estrogeni rilevate in tutte le asine durante l'intera durata dello

studio. Il range dei valori di estrogeni rilevati va da un minimo di 3,08 ad un massimo di 15,61 pg/ml. In letteratura sono riportati nelle asine in fase estrale picchi preovulatori di estrogeni da circa 30 a 65 pg/ml (Henry et al., 1987). Uno studio ancor più accurato rivela l'andamento della concentrazione degli estrogeni nelle varie stagioni, mostrando come questi ormoni mantengano più o meno sempre uno stesso pattern con valori che superano i 10 pg/ml continuando a salire fino a picchi di 45-55 pg/ml durante l'estro e tornando a valori basali in diestro, fase in cui in genere rimangono entro i 5 pg/ml (Contri et al., 2014). In base a questi dati possiamo quindi dire che i valori registrati nel nostro studio rimangono quasi sempre più vicini a valori diestrali rispetto ai valori registrati durante la fase estrale. Quanto detto finora trova riscontro anche nei diametri follicolari rilevati, mai superiori ai 25 mm. Infatti gli estrogeni aumentano durante l'estro come conseguenza di un aumento della crescita e dell'attività delle cellule della granulosa nel follicolo dominante. Nonostante la variabilità nei range riportati dai vari articoli, buona parte dei lavori sull'asina concordano nel definire la dimensione media del follicolo dominante alla comparsa dell'estro intorno ai 25 mm e un diametro tra i 30 e i 40 mm in prossimità dell'ovulazione (Vandeplassche et al., 1981; Kebede et al., 2012; Quaresma e Payan-Carreira, 2014). Nel nostro studio in due asine, Cleopatra e Keka, la situazione ecografica è sempre rimasta stabile, con costante presenza del corpo luteo e assenza di edema e di follicoli di medie o grandi dimensioni, facendo quindi pensare a completa inattività riproduttiva. Negli altri casi invece per quanto si siano riscontrati talvolta follicoli di 25 mm di diametro, non si è mai potuto verificare un loro successivo sviluppo né una concomitante presenza di edema e di valori di progesterone compatibili con una fase estrale. Come unica eccezione si potrebbe ipotizzare un inizio di estro alla fine dello studio in 2 asine in particolare, Rossa ed Eva, che hanno esibito comportamenti estrali tra T38 e T40 dopo aver riportato a T35 livelli di progesterone nettamente in calo e la presenza di più follicoli da 25 mm. A causa dell'interruzione del monitoraggio non si può avere nessuna conferma o smentita in merito. Rimane però da sottolineare il fatto che normalmente in animali ciclici non si riscontrano fino a 6 follicoli di dimensioni simili com'è invece accaduto in questo studio, situazione che sembra più simile a quella di un ovaio in transizione piuttosto che a quella di un ovaio ciclico.

Per quanto riguarda invece i valori di progesterone, seppur fondamentali singolarmente per avere un quadro della situazione clinica, difficilmente ci aiutano a trarre qualche conclusione sull'andamento generale dei cicli nelle 8 asine essendo tali valori caratterizzati da un andamento estremamente variabile e soggettivo.

Nonostante quanto esposto fino ad ora, è interessante notare però che il quadro ormonale ed ecografico riportato non sempre esclude la possibilità che siano avvenute delle ovulazioni. In particolare nel caso di Michela, l'apparente scomparsa del corpo luteo a T21 in presenza di follicoli da 25 mm e la sua successiva ricomparsa a T28 può essere spiegata da un'ovulazione. Negli stessi giorni però troviamo progesterone alto, assenza di edema ed estrogeni bassi. Simili situazioni potrebbero spiegarsi con il verificarsi di ovulazioni durante il diestro; infatti le ovulazioni diestrali sono possibili e riportate nella cavalla con un'incidenza del 10% circa (Newcombe, 1997). È altrettanto vero che la scomparsa del corpo luteo a T21 può aver rappresentato solo apparentemente una lisi dello stesso che può essere stato invece presente ma non rilevabile.

Un ultimo aspetto da considerare nel quadro clinico sono gli esiti riguardanti il DHEA. Il dosaggio del DHEA, un precursore degli androgeni che può essere prodotto a livello di surrenali o di gonadi, è stato effettuato al fine di escludere una sua influenza sui comportamenti estrali riportati. I valori rilevati sono compresi tra 1,13 e 3,31 ng/ml ma a causa della mancanza di altri studi che riportino i dosaggi di tale ormone nell'asina non è possibile stabilire se siano valori nella norma per questa specie. Unico termine di paragone utilizzabile sono dei dosaggi effettuati nella cavalla. In particolare uno studio ha evidenziato come nella cavalla le concentrazioni massime di questo ormone si riscontrino in prossimità di un'ovulazione, senza però che siano necessarie per l'espressione di un comportamento estrale (Rance et al., 1976). I valori riportati nello studio appena menzionato sono nettamente inferiori rispetto ai nostri, con un range al picco preovulatorio tra i 300 e i 720 pg/ml (Rance et al., 1976). In ogni caso dai dati ottenuti non è stato possibile evidenziare un particolare ruolo del DHEA nell'attività sessuale delle asine. Infatti i momenti in cui sono state registrate le concentrazioni maggiori di DHEA non sembrano avere alcuna correlazione con le manifestazioni estrali. Ad esempio se guardiamo i dati di Gigliola notiamo che ha sempre avuto concentrazioni

di DHEA superiori ai 2 ng/ml ma non ha mai manifestato nessun comportamento estrale, mentre Michela seppur con valori di DHEA inferiori ha avuto svariati comportamenti estrali. Unica particolarità osservata nei valori del DHEA è un calo delle concentrazioni dell'ormone in tutte le asine al momento T16. Per quanto interessante da notare non siamo però in grado di dare una spiegazione a questa osservazione.

Se clinicamente gli impianti sembrano aver ottenuto buoni risultati, lo stesso non si può dire riguardo al comportamento estrale. Il 50 % delle asine ha manifestato segni estrali una o più volte nel corso dello studio, con i primi casi già a partire dal momento T9. Si può però affermare che la presenza di manifestazioni estrali in 4 asine su 8 e per un massimo di tre giornate ognuna in un arco di tempo di 40 giorni si possa considerare un miglioramento in una specie che normalmente dovrebbe presentare circa 6 giorni di estro ogni 17-19 giorni di diestro. Tale conclusione va proposta però con cautela a causa del sistema di rilevazione dei comportamenti estrali utilizzato che può verosimilmente aver condotto ad una sottostima dei comportamenti estrali realmente manifestati. Tali comportamenti indesiderati sono anche piuttosto inaspettati in relazione al quadro clinico rilevato. Infatti oltre che in assenza di un quadro ecografico compatibile con l'estro e di alte concentrazioni di estrogeni, talvolta sono avvenuti anche se in presenza di alti valori di progesterone. Gli studi effettuati nella cavalla riportano che il comportamento estrale in genere si manifesta in presenza di alti livelli di estrogeni ma soprattutto con concentrazioni basse di progesterone il quale ha un'azione soppressiva dei comportamenti estrali (Munro et al., 1979), motivo per il quale spesso viene utilizzato per inibire il ciclo estrale e le manifestazioni ad esso correlate. Anche nell'asina si è visto come le concentrazioni di progesterone siano basse (<1 ng/ml) a partire da circa un paio di giorni prima della comparsa del comportamento estrale fino al giorno seguente all'ovulazione, momento in cui invece aumenta la concentrazione degli estrogeni (Henry et al., 1987). A dispetto di ciò nel nostro studio troviamo casi come quello di Ginevra che ha avuto manifestazioni estrali con progesterone alto ed estrogeni bassi e allo stesso tempo asine come Penelope che con progesterone basso ed estrogeni più alti non ha invece mostrato nessuna manifestazione estrale. Di conseguenza risulta difficile interpretare i comportamenti estrali con gli esiti degli esami per la presenza di incongruenze che clinicamente non sappiamo spiegare: alcuni animali hanno

manifestazioni estrali ma non sono in estro. Il comportamento appare quindi slegato da quello che intendiamo come il quadro ovarico ed ormonale tipico dell'estro.

Con buona probabilità il comportamento estrale in questa specie è un comportamento che può essere generato da molti più fattori di quanti siano quelli che normalmente siamo abituati a considerare in altre specie. L'ipotesi più valida è che tali comportamenti possano avere anche un valore sociale e quindi vengano espressi anche in altre occasioni, non permettendo da soli di poter definire l'asina in estro.

Vanno ad avvalorare questa tesi anche le osservazioni riportate che rivelano la possibilità che un'asina non in estro manifesti comportamenti estrali apparentemente indotti dalla vicinanza con un'altra asina che mostra invece il pattern comportamentale tipico dell'estro. Inoltre mentre in genere la lunghezza dell'estro riportata nell'asina è di circa 6 giorni (Blanchard et al., 1999; Taberner et al., 2008; Contri et al., 2014; Quaresma e Payan-Carreira, 2015), le manifestazioni estrali osservate nel corso di questo studio raramente hanno interessato più giorni consecutivi. Tale osservazione potrebbe avvalorare l'ipotesi che non si trattasse in realtà di comportamenti conseguenti all'estro ma ad altri fattori. Poiché come abbiamo visto non si manifestano solamente quando gli animali sono clinicamente in estro ma anche quando non lo sono, è ipotizzabile che solo se reiterati con una certa frequenza e per un tempo sufficientemente lungo tali comportamenti possano essere indicatori di estro.

4.2 Comportamento sociale

In questa seconda parte sono esposti gli esiti delle osservazioni comportamentali effettuate al fine di ottenere un quadro più generale sul comportamento delle asine con o senza gli impianti di deslorelin. Tali osservazioni, volte a valutare il comportamento sociale con i conspecifici e nell'interazione con l'uomo, evidenziano quindi eventuali variazioni comportamentali post impianto. Il monitoraggio comportamentale si compone di 3 parti distinte

- Osservazioni sociali effettuate sull'intero gruppo di asini
- Osservazione di situazioni di interazione con persone sconosciute
- Questionari per gli operatori del centro

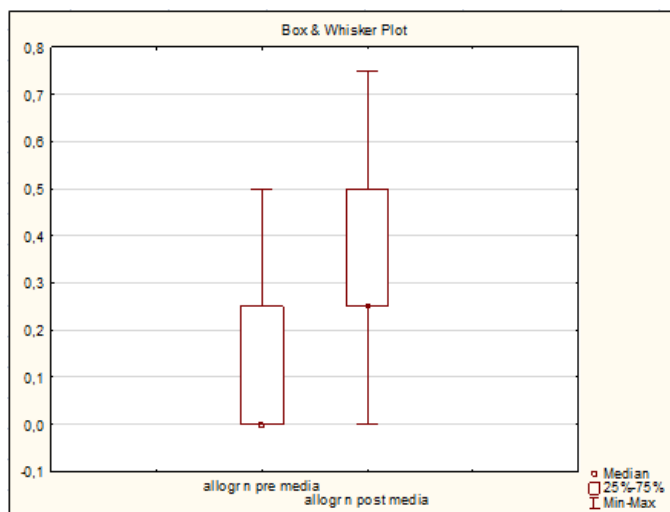
4.2.1 Osservazioni sociali

In tabella 21 sono illustrati gli esiti del confronto tra le osservazioni sociali effettuate su tutto il gruppo di asini nel periodo pre impianto e quelle del periodo post. Rispetto al pre, nel post impianto si è osservato un aumento del numero di episodi di allogrooming ($P=0,012$; $Z=2,52$) e della loro durata ($P=0,037$; $Z=2,09$). Inoltre è stato registrato un aumento dei comportamenti riproduttivi nel post impianto ($P=0,018$; $Z=2,37$).

PROSSIMITA'	N° episodi	Nessuna variazione significativa
	Durata	Nessuna variazione significativa
ALLOGROOMING	N° episodi	Aumento nel post ($P= 0,012$; $Z= 2,52$)
	Durata	Aumento nel post ($P= 0,037$; $Z= 2,09$)
COMPORAMENTI AGONISTICI	N° episodi	Nessuna variazione significativa
COMPORAMENTI RIPRODUTTIVI	N° episodi	Aumento nel post ($P= 0,018$; $Z= 2,37$)
ALTRI	N° episodi	Nessuna variazione significativa

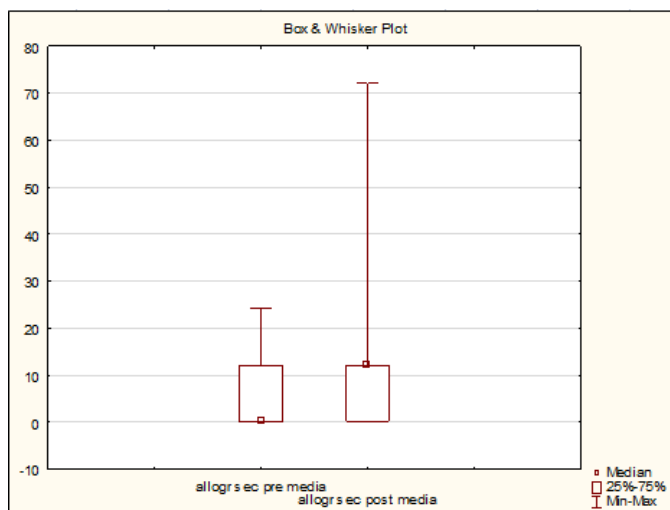
Tabella 21. Esiti osservazioni sociali, confronto tra pre e post impianto

Nei grafici seguenti (fig. 28, 29 e 30) sono mostrati nel dettaglio i valori dei comportamenti che hanno subito una variazione tra pre e post. I range di valori mostrati nei grafici sono stati ottenuti facendo la media tra i valori dei giorni dello stesso periodo di ciascun asino. Inoltre sono riportate le mediane di tali valori medi.



La media del numero di episodi di allogrooming per ogni asino varia da 0 a 0,5 con mediana 0 nel periodo pre impianto. Nel post varia invece da 0 a 0,75 con mediana 0,25.

Figura 28. Numero episodi di allogrooming, confronto tra valori medi pre e post impianto.



La media della durata in secondi degli episodi di allogrooming per ogni asino è compresa tra 0 e 24 secondi con mediana 0 nel pre e tra 0 e 72 secondi con mediana 12 nel post.

Figura 29. Durata episodi di allogrooming, confronto tra valori medi pre e post impianto.

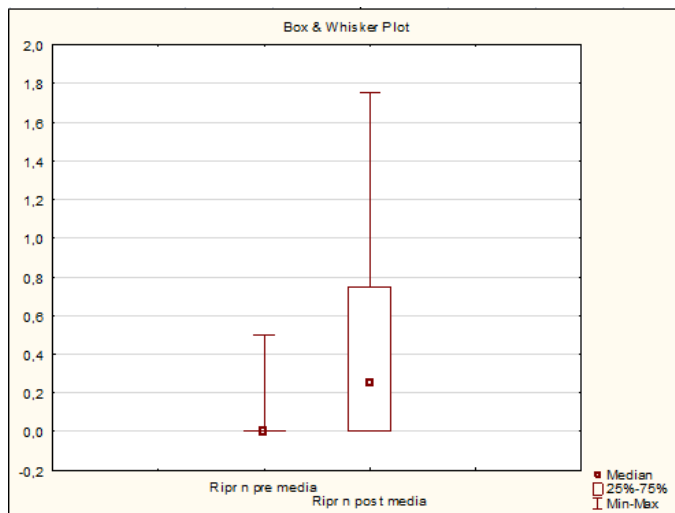


Figura 30. Numero episodi comportamenti riproduttivi, confronto tra valori medi pre e post impianto

Il numero medio di episodi riproduttivi per ogni asino, compreso tra 0 e 0,5 con mediana 0 nel pre, è aumentato nel post con un intervallo tra 0 e 1,75 e mediana 0,25.

Nelle osservazioni sociali che evidenziano dinamiche relazionali con i conspecifici, l'aumento nel post degli episodi ($P=0,012$; $Z=2,52$) e della durata ($P=0,037$; $Z=2,09$) del comportamento di allogrooming può essere visto come un effetto positivo degli impianti sull'intensità delle relazioni di gruppo. Non avendo precedenti in letteratura né per quanto riguarda gli esiti di impianti di deslorelin sulle asine né per gli esiti sul comportamento in senso generale anche su altre specie, è difficile confermare l'effettiva connessione tra le due cose. Per rilevare un effetto positivo degli impianti sulle dinamiche di gruppo sarebbe stata auspicabile anche una diminuzione dei comportamenti agonistici. Il fatto che non abbiano subito variazioni significative può comunque essere considerato un buon risultato.

L'aumento dei comportamenti riproduttivi nel periodo post impianto ($P=0,018$; $Z=2,37$) risulta invece inatteso quanto indesiderato. Sono però da considerare due fattori che possono aver influito su questo risultato: il protocollo di sincronizzazione effettuato e la durata ridotta della fase pre impianto. Avendo sincronizzato le asine nelle settimane prima dell'impianto in preparazione allo stesso, era prevedibile che al momento delle osservazioni si trovassero tutte più o meno alla medesima fase del loro ciclo estrale, più in particolare si prevedeva un diestro alle prime osservazioni e una probabile comparsa

degli estri a partire dalla terza giornata. Questo avrebbe potuto garantire la possibilità di un confronto con entrambe le situazioni normalmente riscontrate in assenza dell'impianto. In realtà si è osservata una sola asina con comportamenti estrali e solo durante la quarta giornata di osservazioni pre impianto. Il confronto tra la quantità di comportamenti sessuali rilevati nel pre e quella rilevata nel post può quindi essere falsato sia dal protocollo di sincronizzazione e dalla scarsa risposta ottenuta sia dal fatto che a differenza delle osservazioni post, suddivise in un arco temporale di 40 giorni, quelle pre siano state concentrate nell'arco della stessa settimana e abbiano quindi avuto minor possibilità di osservare le asine in fasi diverse del loro ciclo. Resta comunque il fatto che obiettivo dello studio era quello di ottenere un'inibizione del ciclo estrale ma soprattutto dei comportamenti sessuali ad esso correlati, risultato ottenuto solo in parte.

4.2.2 Interazione con le persone

L'analisi dei video realizzati durante le occasioni di interazione con persone sconosciute, ha portato a dei risultati che indicano variazioni significative del comportamento solo per quanto riguarda il numero degli episodi e la latenza in presenza dell'uomo e il punteggio del saluto finale nel caso della donna (tabella 22). Con il volontario uomo, il numero di episodi di presenza delle asine è diminuito nel post impianto ($P= 0,018$; $Z= 2,37$), contestualmente ad un aumento nella latenza ($P= 0,012$; $Z= 2,52$). Con la volontaria donna invece la variazione ha riguardato il saluto finale, con un aumento dei punteggi nel post impianto ($P=0,036$; $Z= 2,10$). I comportamenti agonistici nei confronti della persona non sono stati analizzati a causa dell'esiguità degli episodi. Infatti è stato rilevato un unico comportamento agonistico durante la fase pre impianto.

N° EPISODI	Uomo	Diminuzione nel post ($P= 0,018$, $Z=2,37$)
	Donna	Nessuna variazione significativa
LATENZA	Uomo	Aumento nel post ($P= 0,012$, $Z= 2,52$)
	Donna	Nessuna variazione significativa
DURATA	Uomo	Nessuna variazione significativa
	Donna	Nessuna variazione significativa
INTERAZIONE	Uomo	Nessuna variazione significativa
	Donna	Nessuna variazione significativa
SOVRAPPOSIZIONE	Uomo	Nessuna variazione significativa
	Donna	Nessuna variazione significativa
COMPORAMENTI AFFILIATIVI	Uomo	Nessuna variazione significativa
	Donna	Nessuna variazione significativa
SALUTO FINALE	Uomo	Nessuna variazione significativa
	Donna	Aumento punteggi post ($P= 0,036$, $Z= 2,10$)

Tabella 22. Esiti dell'analisi dei video di interazioni con le persone, confronto tra pre e post impianto.

Nei grafici sottostanti (fig. 31,32 e 33) sono illustrate nel dettaglio le variazioni avvenute tra pre e post impianto. I range di valori mostrati nei grafici sono stati ottenuti facendo la media tra i valori delle interazioni dello stesso periodo di ogni asina. Inoltre sono riportate le mediane di tali valori medi.

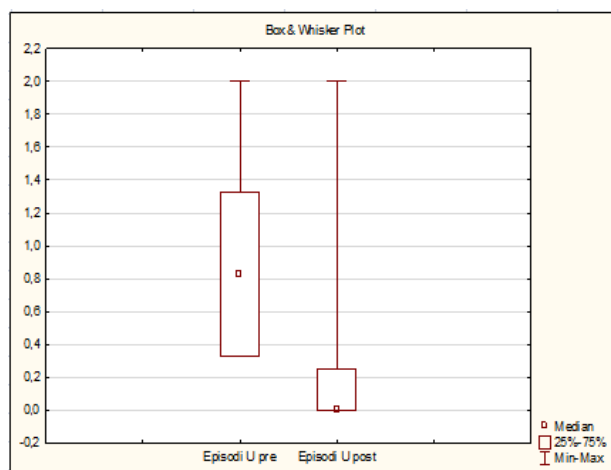


Figura 31. Numero episodi con volontario uomo, confronto tra valori medi del pre e post impianto.

Il numero di episodi medio di ogni asina con l'uomo è stato compreso tra 0,33 e 2 con mediana vicina a 0,8 nel pre mentre è diminuito nel post, con un intervallo tra 0 e 2 e mediana 0.

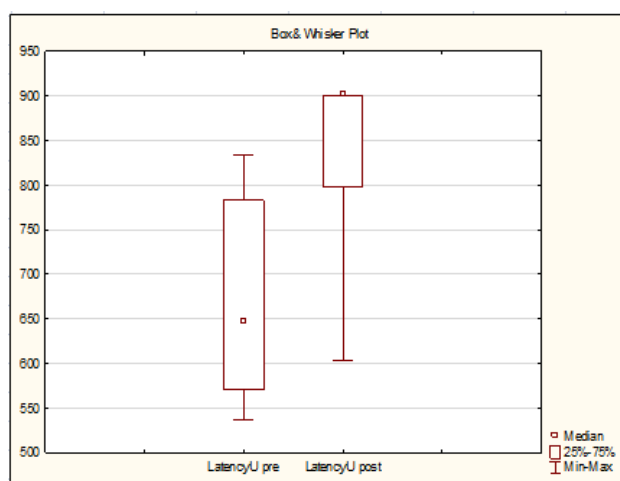


Figura 32. Latenza con volontario uomo, confronto tra valori medi del pre e post impianto.

In presenza del volontario uomo è inoltre aumentato il tempo di latenza medio di ogni asina il cui intervallo nel pre era tra 537 e 833 secondi con mediana 650, mentre nel post è stato tra 603 e 901 con mediana 901.

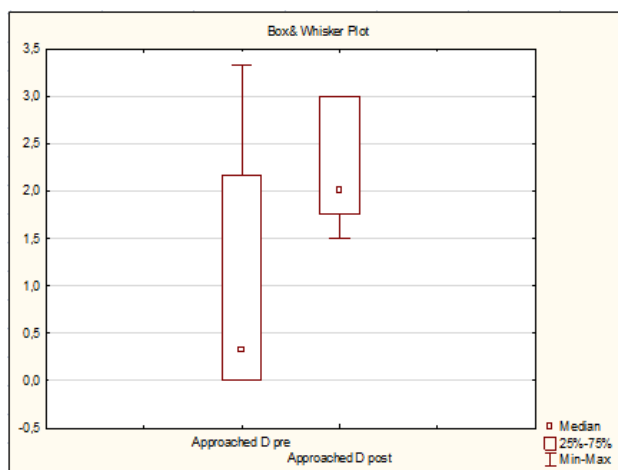


Figura 33. Punteggi saluti finali con volontaria donna, confronto tra valori medi del pre e post impianto.

Per quanto riguarda invece la donna si è osservato un netto aumento nella media dei punteggi assegnati alle asine nella fase del saluto finale. Nel pre il range è stato compreso tra 0 e 3,33 con una mediana di circa 0,3, nel post tra 1,5 e 3 con mediana 2.

Tali risultati rappresentano sostanzialmente un peggioramento nel post impianto nella quantità delle interazioni con l'uomo da parte delle asine ma allo stesso tempo un miglioramento nella qualità delle interazioni ottenute dalla donna nel corso dei saluti finali. Ciò non ci permette di affermare molto riguardo l'influenza degli impianti sulla capacità di interazione con le persone da parte delle asine. Non è possibile inoltre escludere un'influenza sul comportamento degli animali legata allo specifico individuo; infatti è bene ricordare che le persone che hanno partecipato alle osservazioni del post impianto erano diverse da quelle del pre impianto. Questo per evitare che nel post impianto le persone non fossero più sconosciute alle asine, avendole già conosciuto nel corso della fase pre impianto. Ad ogni modo è possibile affermare che in seguito all'impianto non si sono potute osservare differenze sostanziali né in miglioramento né tanto meno in calo della capacità di interazione.

4.2.3 Questionari

Per motivi organizzativi e per il carico di lavoro, il personale del centro non è stato in grado di compilare in modo completo i questionari che risultano molto parziali ed imprecisi. Per questo motivo sono stati esclusi dall'elaborazione dei risultati.

5. CONCLUSIONE

L'obiettivo dello studio era quello di trovare una soluzione per l'inibizione dell'estro e dei comportamenti ad esso correlati in asine impiegate in IAA, ma i risultati emersi dalla sperimentazione non si sono rivelati pienamente soddisfacenti per questo scopo. Il punto fondamentale in questo caso per decretare la buona riuscita del test era legato all'estinzione del comportamento sessuale delle asine nel post impianto. Anche se clinicamente la risposta al deslorelin è stata soddisfacente, dal punto di vista del comportamento non sono stati ottenuti i risultati sperati. Infatti nella metà delle asine si sono verificati comportamenti estrali per tutta la durata dello studio.

Questo lavoro ha evidenziato come il comportamento dei soggetti coinvolti nello studio non si possa considerare un biomarcatore affidabile per valutare lo stato estrale. Infatti è possibile che i comportamenti ritenuti indicatori dell'estro abbiano anche altre cause scatenanti legate probabilmente ad un significato sociale e di mantenimento dell'equilibrio nella popolazione. Se visti in quest'ottica si tratta quindi di interazioni finalistiche e non completamente sopprimibili in asini che vivono in un contesto di gruppo. Per questo motivo appare improbabile che anche con l'uso di altre metodiche di inibizione della ciclicità sia possibile rimuovere completamente le manifestazioni estrali. Ne è prova il fatto che nella cavalla siano riportati comportamenti estrali anche in seguito all'applicazione di metodi risolutivi come l'ovariectomia (Asa et al., 1980).

Il problema a questo punto riconduce a monte nelle linee guida ministeriali che non considerano che negli asini lo stato estrale ha una frequenza annuale molto più elevata rispetto ad altre specie e che il comportamento estrale è indotto probabilmente anche da fattori sociali. Sospendere categoricamente le attività dei soggetti con tale frequenza porterebbe di fatto ad un importante danno economico. A nostro avviso sarebbe quindi auspicabile rivalutare tale limitazione e affidare alla sensibilità del conduttore la scelta se escludere o meno un soggetto dall'attività a garanzia dell'incolumità degli utenti. Di base rimane comunque la necessità di approfondire la conoscenza sui meccanismi che stanno alla base del comportamento estrale in questa specie per la quale saranno necessari altri studi in futuro.

Allegato 2. Questionario per gli operatori del centro.

DATA: _____ Periodo Pre-impianto: Post-impianto:

Nome addetto: _____

Nome asina: _____

Questionario inerente l'attività del periodo in oggetto (da presentare nell'ultimo giorno di osservazioni pre e post impianto)

1. Valuti il livello durante il periodo in oggetto di:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
tranquillità										
aggressività verso gli altri soggetti										
aggressività verso le persone										
stress										
tolleranza alle manipolazioni										
attività fisica										
disponibilità a interagire con l'utente										
approccio attivo alle persone										

2. Se presente, in che modo si è espressa l'aggressività e verso quale/i soggetto/i si è manifestata?

3. Se presente, in che modo si è manifestato lo stress?

4. Secondo lei, l'animale quanto tempo ha passato durante il periodo in oggetto in un luogo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Isolato dagli altri animali										
Isolato dalle persone										

5. La frequenza con cui l'animale si è avvicinato alle persone durante il periodo in oggetto, rispetto al solito, è

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Nota anche cambiamenti nel modo in cui l'animale si avvicina? Se sì, quali cambiamenti ha notato?

6. Dal punto di vista dell'onoterapia, come giudica durante il periodo in oggetto l'attività dell'animale? Il suo comportamento è risultato adeguato? si è avvicinato nel modo corretto alle persone?

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

7. In questo periodo, indichi quanto il soggetto sia stato:

	Molto meno	Un po' meno	Come al solito	Un po' più	Molto più
tranquillo					
aggressivo verso gli altri asini					
aggressivo verso le persone					
stressato					
tollerante verso le manipolazioni					
attivo fisicamente					
disponibile a interagire con l'utente					
con un approccio attivo verso le persone					

8. In questo periodo, quanto tempo ha passato l'animale in un luogo isolato?

	Molto meno	Un po' meno	Come al solito	Un po' più	Molto più
rispetto agli altri animali					
rispetto alle persone					

9. La frequenza con cui l'animale si avvicina alle persone rispetto al solito, è:

Molto meno	Un po' meno	Come al solito	Un po' più	Molto più

10. Dal punto di vista dell'onoterapia, come giudica in questo periodo l'attività dell'animale? Il suo comportamento è risultato adeguato? si è approcciato nel modo corretto alle persone?

Molto meno	Un po' meno	Come al solito	Un po' più	Molto più

Quali comportamenti dell'animale hanno portato ad una valutazione peggiore o migliore del solito?

11. In questo periodo, l'animale ha mostrato segni tipici del calore? (masticazione, minzione frequente, spostamento laterale della coda, esposizione ripetuta del clitoride)

Si ; No

12. Ha notato dei cambiamenti, non già elencati, dell'animale?

13. C'è qualcosa che vorrebbe segnalare?

7. BIBLIOGRAFIA

- Asa, C. S., D. A. Goldfoot, M. C. Garcia and O. J. Ginther. 1980. Sexual behavior in ovariectomized and seasonally anovulatory pony mares (*Equus caballus*). *Hormones and behavior* 14(1): 46-54.
- Asa, C. S., D. A. Goldfoot, M. C. Garcia and O. J. Ginther. 1984. The effect of estradiol and progesterone on the sexual behavior of ovariectomized mares. *Physiology & Behavior* 33(5): 681.
- Battocchio, M., Gabai G., Mollo A., Veronesi M.C., Soldano F., Bono G. and Cairoli F. 1999. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. *Theriogenology* 51: 1059-1069
- Beja Pereira, A., P. R. England, N. Ferrand, S. Jordan, A. O. Bakhiet, M. A. Abdalla, M. Mashkour, J. Jordana, P. Taberlet and G. Luikart. 2004. African origins of the domestic donkey. *Science* 304(5678): 1781.
- Blanchard, T. L., T. S. Taylor and C. L. Love. 1999. Estrous cycle characteristics and response to estrus synchronization in mammoth asses (*Equus asinus americanus*). *Theriogenology* 52(5): 827.
- Camillo, F., I. Vannozzi, M. Tesi, C. Sabatini, A. Rota, E. Paciolla, I. Dang Nguyen and D. Panzani. 2014. Induction of ovulation with buserelin in jennies: in search of the minimum effective dose. *Animal Reproduction Science* 151(1-2): 56.
- Carluccio, A., U. Tosi, A. Contri, I. De Amicis and M. C. Veronesi. 2006. Corpus luteum sensitivity to PGF 2α administration in the Martina Franca jenny. *Vet Res Commun* 30:171-3.
- Carluccio, A., S. Panzani, A. Contri, U. Tosi, I. De Amicis and M. C. Veronesi. 2008. Luteal function in jennies following PGF 2α treatment 3 days after ovulation. *Theriogenology* 70:121-125.
- Ceva Vetem, 2012. Gabbrostim® foglietto illustrativo (N. 608528-53). Ceva Salute Animale S.p.A. Agrate Brianza (MB) e Vetem S.p.A. Porto Empedocle (AG).
- Contri, A., D. Robbe, A. Gloria, I. De Amicis, M. C. Veronesi and A. Carluccio. 2014. Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. *Theriogenology* 81(5): 657.
- Diel de Amorim, M., Chenier T. and Manning S. 2016. Complications associated with intrauterine glass marbles in five mares. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 249(10): 1196-1201.
- D'Occhio, M., T. Whyte, T. Jubb, L. Fitzpatrick, N. Cooper, W. Aspden, M. Bolam, T. Trigg and G. Fordyce. 2002. Use of GnRH agonist implants for long-term suppression of fertility in extensively managed heifers and cows. *Animal Reproduction Science* 74:151-162.
- Donovan, C. E., T. Hazzard, A. Schmidt, J. LeMieux, F. Hathaway and M. A. Kutzler. 2013. Effects of a commercial canine gonadotropin releasing hormone vaccine on estrus suppression and estrous behavior in mares. *Animal Reproduction Science* 142(1-2): 42.

- Elhay, M., A. Newbold, A. Britton, P. Turley, K. Dowsett and J. Walker. 2007. Suppression of behavioural and physiological oestrus in the mare by vaccination against GnRH. *Australian Veterinary Journal* 85:39-45.
- Evans, M. J., N. E. Kitson, S. L. Alexander, C. H. G. Irvine, J. E. Turner, N. R. Perkins and J. H. Livesey. 2002. Effectiveness of an antagonist to gonadotrophin releasing hormone on the FSH and LH response to GnRH in perfused equine pituitary cells, and in seasonally acyclic mares. *Animal Reproduction Science* 73(1/2): 37-51.
- Freeman, C. and Lyle S.K. 2015. Chronic intermittent colic in a mare attributed to uterine marbles. *Equine veterinary education* 27(9): 469-473.
- Gabai, G., Marinelli L., Simontacchi C. and Bono G. 2004. The increase in plasma C19 Δ 5 steroids in subcutaneous abdominal and jugular veins of dairy cattle during pregnancy is unrelated to estrogenic activity. *Steroids*69: 121-127
- Gass, G.H., Coats D. and Graham N. 1964. Carcinogenic dose-response curve to oral diethylstilbestrol. *Journal of the National Cancer Institute*. 33: 971-977
- Ginther, O. J., S. T. Scraba and D. R. Bergfelt. 1987. Reproductive seasonality of the jenny. *Theriogenology* 27(4): 587-592.
- Henry, M., A. E. Figueiredo, M. S. Palhares and M. Coryn. 1987. Clinical and endocrine aspects of the oestrous cycle in donkeys (*Equus asinus*). *Journal of reproduction and fertility*. Supplement 35:297.
- Henry, M., L. Lodi and M. Gastal. 1998. Sexual behaviour of domesticated donkeys (*Equus asinus*) breeding under controlled or free range management systems. *Applied Animal Behaviour Science* 60:263-276.
- Herbert, C. A. and T. E. Trigg. 2005. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Animal Reproduction Science* 88(1-2): 141-153.
- Imboden, I., F. Janett, D. Burger, M. A. Crowe, M. Hässig and R. Thun. 2006. Influence of immunization against GnRH on reproductive cyclicity and estrous behavior in the mare. *Theriogenology* 66(8): 1866.
- Jöchle, W. and T. E. Trigg. 1994. Control of ovulation in the mare with ovuplant a short-term release implant (STI) containing the GNRH analogue deslorelin acetate: studies from 1990 to 1994. *Journal of equine veterinary science* 14(12): 632-644.
- Johnson, C. A., D. L. J. Thompson, K. M. Kulinski and A. M. Guitreau. 2000. Prolonged interovulatory interval and hormonal changes in mares following the use of Ovuplant to hasten ovulation. *Journal of equine veterinary science* 20(5): 331-336.
- Johnson, C. A., D. L. Thompson and J. A. Cartmill. 2002. Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation. *Journal of animal science* 80(10): 2681-7.
- Johnson, C. A., D. L. Thompson and J. A. Cartmill. 2003. Effects of deslorelin acetate implants in horses: single implants in stallions and steroid-treated geldings and multiple implants in mares. *Journal of animal science* 81(5): 1300-7.
- Kebede, H., A. Lemma and H. Negussie. 2012. Ultrasonographic studies on ovarian dynamics and associated estrus manifestations of jennies under

- controlled management, Ethiopia. *Tropical animal health and production* 44(8): 1965.
- Klabnik-Bradford, J., Ferrer M.S., Blevins C. and Beard L. 2013. Marble-induced pyometra in an Appaloosa mare. *Clinical Theriogenology Journal* 5: 410
 - Liu, I. K. M., M. Bernoco and M. Feldman. 1989. Contraception in mares heteroimmunized with pig zonae pellucidae. *Journal of reproduction and fertility* 85(1): 19-29.
 - Marinelli, L., Trevisi E., Da Dalt L., Merlo M., Bertoni G. and Gabai G. 2007. Dehydroepiandrosterone secretion in dairy cattle is episodic and unaffected by ACTH stimulation. *Journal of Endocrinology* 194: 627-635
 - Martin P. and Bateson P. 1993. Measuring behaviour: An introductory guide. Cambridge University Press
 - McCue, P. M., S. S. Lemons, E. L. Squires and D. K. Vanderwall. 1997. Efficacy of Synovex-S implants in suppression of estrus in the mare. *Journal of equine veterinary science* 17(6): 327-329.
 - McCue, P. M. 2003. Estrus suppression in performance horses. *Journal of equine veterinary science* 23 (8):342-344.
 - McDonnell, S. M. 1998. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). *Applied Animal Behaviour Science* 60(2/3): 277.
 - Miller, L.A., Johns, B. E. and Killian, G. J. 2003. Immunocontraception of white-tailed deer with GnRH vaccine. *American Journal of Reproductive Immunology* 44(5): 266-274
 - Moehlman, P. 1998. Behavioral patterns and communication in feral asses (*Equus africanus*). *Applied Animal Behaviour Science* 60:125-169.
 - Morris, L., Fraser B.S.L., Cantley C. and Wilsher S. 2017. The hazards associated with the use of intrauterine glass balls to suppress oestrus in mares. *Equine veterinary education* 29(3): 125-130.
 - Munro, C. D., J. P. Renton and R. Butcher. 1979. The control of oestrous behaviour in the mare. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*(27): 217.
 - Munson, L., Baumann J.E., Asa C.S., Jöchle W., Trigg T.E., Concannon P., England P., Farstad W., LindeForsberg C., Verstegen J. and Doberska C. 2001. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 57:269-73
 - Newcombe, J. R. 1997. The incidence of ovulation during the luteal phase from day 4 to day 20 in pregnant and non pregnant mares. *Journal of Equine Veterinary Science* 17(3): 120-122.
 - Nie, G., K. Johnson, T. Braden and J. G. W. Wenzel. 2003. Use of an intra-uterine glass ball protocol to extend luteal function in mares. *Journal of equine veterinary science* 23(6): 266-273.
 - Nishikawa, Y. 1959. Studies on Reproduction in Horses. Tokyo: Japan Racing Assoc., Shiba Temuracho Minotoku, p. 340.
 - Nobelius, A.M. 1992. Gestagens in the mare: an appraisal of the effects of gestagenic steroids on suppression of oestrus in mares. Clayton, Vic.: Monash University
 - Pfizer Animal Health Australia, 2008. Equity® Package Label (N° ABN 50 008 422 348). Pfizer Animal Health Australia, West Ryde, AU.

- Plotka, E. D., D. N. Vevea, T. C. Eagle, J. R. Tester and D. B. Siniff. 1992. Hormonal contraception of feral mares with Silastic rods. *Journal of wildlife diseases* 28(2): 255-262.
- Porter, M.B. and Sharp D.C. 2002. Gonadotropin-releasing hormone receptor trafficking may explain the relative resistance to pituitary desensitization in mares. *Theriogenology* 58(2-4): 523-526.
- Powers, J., Baker D., Davis T., Conner M., Lothridge A. and Nett T. 2011. Effects of gonadotropin-releasing hormone immunization on reproductive function and behavior in captive female rocky mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Biology of reproduction* 85(6): 1152-1160.
- Pugh D. G. 2002. Donkey Reproduction. In proceedings of the Annual Convention of the AAEP 2002, vol.48.
- Quaresma, M., S. R. Silva and R. Payan Carreira. 2015. Reproductive Patterns in the Non-Breeding Season in Asinina de Miranda Jennies. *Reproduction in domestic animals* 50(5): 784.
- Quaresma, M. and R. Payan Carreira. 2015. Characterization of the estrous cycle of Asinina de Miranda jennies (*Equus asinus*). *Theriogenology* 83(4): 616.
- Rance, T. A., B. K. Park, P. H. Rowe and P. D. Dean. 1976. A preovulatory rise of dehydroepiandrosterone in the mare measured by radioimmunoassay. *The Journal of steroid biochemistry* 7(9): 677.
- Romagnoli, S., C. Milani, D. Gelli, M. E. Falomo, A. Mollo and C. Stelletta. 2009. Clinical Use of Deslorelin for the Control of Reproduction in the Bitch. *Reproduction in domestic animals* 44:36-39.
- Schulman, M. 2013. Reversibility of the effects of GnRH-vaccination used to suppress reproductive function in mares. *Equine veterinary journal* 45(1): 111-113.
- Sharp, D. C. 1980. Factors associated with the maternal recognition of pregnancy in mares. *The Veterinary clinics of North America. Large animal practice* 2(2): 277-290.
- Stabenfeldt, G. H., J. P. Hughes, J. W. Evans and D. P. Neely. 1974. Spontaneous prolongation of luteal activity in the mare. *Equine veterinary journal*(4): 158-163.
- Stout, T. and B. Colenbrander. 2004. Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. *Animal Reproduction Science* 82-3:633-643.
- Taberner, E., A. Medrano, A. Peña, T. Rigau and J. Miró. 2008. Oestrus cycle characteristics and prediction of ovulation in Catalanian jennies. *Theriogenology* 70(9): 1489-1497.
- Thompson, D. L. J. 2000. Immunization against GnRH in male species (comparative aspects). *Animal Reproduction Science* 459-469.
- Toydemir, T. S. F., M. R. Kiliçarslan and V. Olgaç. 2012. Effects of the GnRH analogue deslorelin implants on reproduction in female domestic cats. *Theriogenology* 77(3): 662.
- Trigg, T., Wright P.J., Armour A.F., Williamson P.E., Junaidi A., Martin G.B., et al. 2001. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *Journal of reproduction and fertility. Supplement* 57:255-261.

- Trigg, T. E., A. G. Doyle, J. D. Walsh and T. Swangchan-uthai. 2006. A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 66(6–7): 1507-1512.
- Turner, R., Vanderwall D.K. and Stawicki R. 2015. Complications associated with the presence of two intrauterine glass balls used for oestrus suppression in a mare. *Equine veterinary education* 27(7): 340-343.
- Vandeplassche, G. M., J. A. Wesson and O. J. Ginther. 1981. Behavioral, follicular and gonadotropin changes during the estrous cycle in donkeys. *Theriogenology* 16(2): 239.
- Vanderwall, D. 2016. How to Use Oxytocin Treatment to Prolong Corpus Luteum Function for Suppressing Estrus in Mares. *Journal of equine veterinary science* 36:1-4.
- Visentin, F. 2016. Comportamenti sociali intraspecifici nell'asino domestico (*Equus asinus*). Relatore Normando S. Correlatore Marinelli L. Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute e Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria, Università degli studi di Padova, Legnaro.
- 25 Marzo 2015. Accordo tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento recante “*Linee guida nazionali per gli interventi assistiti con gli animali (IAA)*”. Rep. Atti n. GO/CSR del 25 Marzo 2015.

8. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio i miei genitori per aver reso possibile la realizzazione di questo sogno, per avermi sempre incoraggiata e sostenuta nonostante le mie mille incertezze. Grazie per aver dato grande importanza alla mia formazione e per il supporto che non mi avete mai negato.

Ringrazio Matteo, il compagno di vita più paziente, attento e premuroso che avrei mai potuto sperare di incontrare, sostegno fondamentale per il raggiungimento di questo obiettivo. Grazie per continuare ad amarmi ogni giorno come se fosse il primo.

Ringrazio Elisa, perché se gli amici sono la famiglia che scegliamo per noi stessi lei è senza dubbio la miglior scelta che potessi fare. La ringrazio per essere come una sorella, un'amica, una collega, una consigliera ... tutte insieme!

Ringrazio Simone per avermi sopportata fin dai miei primi istanti di vita, per la bellissima infanzia che abbiamo condiviso e per il sostegno che mi dona ancora oggi.

Ringrazio la Nonna Pia per essere la miglior nonna che ci sia, grande fonte di consigli e di conforto.

Ringrazio Sara, Costanza, Anna e Alessia, le coinquiline con cui ho condiviso questi anni da fuorisede, grazie per la compagnia, le risate, la pazienza e l'appoggio che hanno reso bella la nostra convivenza.

Ringrazio tutti i compagni di corso che in qualche modo mi hanno aiutata ad arrivare in fondo a questo percorso, ma in particolare ringrazio Elena, formidabile compagna di studi ma non solo.

Ringrazio la professoressa Falomo per avermi dato la possibilità di avventurarmi in questo studio, per l'aiuto, il costante ottimismo e per l'esemplare dedizione a questo lavoro.

Ringrazio Francesca per il supporto tecnico senza il quale starei ancora impaginando la tesi, oltre che per la vera amicizia dimostrata in tanti anni.

Ringrazio Anna e Francesco per essersi prestati come volontari e tutto lo staff della Città degli asini per la disponibilità dimostrata, grazie per aver contribuito alla realizzazione dello studio sperimentale alla base di questa tesi.

Ringrazio Ginevra, Eva, Cleopatra, Keka, Gigliola, Rossa, Penelope e Michela, grandi protagoniste di questa tesi. Grazie a loro ho scoperto quanto gli asini siano animali straordinari.

Infine ringrazio tutti gli animali con cui ho condiviso una parte più o meno grande della mia vita. Se ho intrapreso questo lungo, difficile ma bellissimo percorso lo devo solo a loro.