



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

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

**SOPPRESSIONE DELL'ATTIVITA' RIPRODUTTIVA  
E VARIAZIONI COMPORTAMENTALI IN GATTI  
MASCHI TRATTATI CON UN IMPIANTO DA 9.4 MG  
DI DESLORELIN (SUPRELORIN 12, VIRBAC).**

Laureanda: Camilla Righetti  
matricola 576088

Relatore: Ch.mo Prof. Stefano Romagnoli

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

# INDICE

RIASSUNTO .....	4
1. INTRODUZIONE .....	5
1.1 Cenni di fisiologia riproduttiva del gatto maschio .....	11
1.2 Scopo della tesi .....	15
2. MATERIALI E METODI .....	17
2.1 Animali coinvolti nella ricerca .....	17
2.2 Protocollo sperimentale .....	19
2.3 Controlli successivi .....	30
2.4 Analisi statistiche .....	31
3. RISULTATI .....	32
3.1 Visita clinica ed esami del sangue.....	32
Esame obiettivo generale	
Esami del sangue	
Peso corporeo	
Sito d'impianto	
3.2 Esame clinico dell'apparato riproduttore .....	39
Misure testicolari	
Spicole peniene	

3.3	Concentrazione sierica del testosterone .....	50
	Livelli di testosterone basale e test di stimolo con GnRH	
	Livelli di testosterone post-stimolo con GnRH	
3.4	Prelievo di seme .....	56
	Produzione spermatica	
	Valutazione della motilità	
	Valutazione morfologica	
	Conta spermatica	
3.5	Risultati dei questionari.....	64
3.6	Esame istologico testicoli soggetto 12 .....	69
4	DISCUSSIONE .....	72
5	CONCLUSIONE .....	87
6	ALLEGATI.....	90
7	BIBLIOGRAFIA .....	96
8	RINGRAZIAMENTI.....	105

# RIASSUNTO

Lo studio è stato effettuato su un campione costituito da 12 gatti maschi adulti, interi, di età compresa tra 6 mesi e 5 anni. Il gruppo è risultato eterogeneo per quanto riguarda peso, abitudini di vita e luogo di provenienza. Tutti i soggetti erano di razza Comune Europea, con l'eccezione di un Sacro di Birmania ed un incrocio tra Comune Europeo ed Angora Turco. La sperimentazione si proponeva di valutare l'effetto dell'impianto di deslorelin 9.4 mg sulla soppressione dell'attività riproduttiva tramite la determinazione dei livelli ormonali di testosterone post-stimolo con GnRH, lo studio del comportamento mediante un questionario per la valutazione delle caratteristiche comportamentali e la valutazione dell'effetto del farmaco sulla qualità seminale.

Alla prima visita i soggetti sono stati sottoposti ad un esame obiettivo generale, un esame obiettivo particolare dell'apparato riproduttore ed è stato eseguito un esame emocromo-biochimico completo per la valutazione dello stato di salute. È stata effettuata la stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo mediante somministrazione di GnRH (Fertagyl®, Intervet) per determinare dopo un'ora la concentrazione sierica di testosterone. I soggetti sono stati sottoposti anche ad un prelievo di seme mediante cateterismo uretrale dopo somministrazione di medetomidina per la valutazione della presenza, motilità e morfologia degli spermatozoi. È stato poi applicato un impianto di deslorelin acetato da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) a livello sottocutaneo in metà soggetti tra le scapole e nell'altra metà caudalmente all'ombelico.

Il protocollo ha previsto il monitoraggio dei soggetti mediante visite di controllo in cui sono stati ripetuti esame obiettivo generale e riproduttivo, test di stimolazione con GnRH e dosaggio del testosterone dopo un'ora, prelievo di seme e questionario ai proprietari. I soggetti sono stati monitorati in media per 8 mesi (range 40 giorni- 13 mesi) dal giorno dell'impianto: le visite sono state eseguite ogni 15-20 giorni nei primi 2 mesi, ogni 2 mesi fino ai 6 mesi e poi ogni 6 mesi.

I risultati della sperimentazione hanno dimostrato l'efficacia del farmaco nella soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo in tutti i soggetti durante tutto il periodo di monitoraggio determinando un calo significativo del livello sierico di testosterone post-stimolazione già a 15 giorni di distanza dall'impianto. È stata inoltre evidenziata la riduzione significativa delle dimensioni testicolari oltre alla scomparsa delle caratteristiche spicole cornee, tipico carattere sessuale secondario nel gatto maschio adulto.

È stato possibile valutare l'andamento della produzione spermatica in 7 dei 12 gatti: in 5 di questi è stata documentata la scomparsa degli spermatozoi nel materiale seminale ai prelievi eseguiti in media a 2 mesi dall'impianto, mentre negli altri due soggetti si è riscontrata la permanenza degli spermatozoi, seppur non motili, anche a successivi prelievi eseguiti al terzo e quarto mese post-trattamento.

Il peso dei soggetti non ha subito variazioni significative, anche se dal punto di vista etologico si è notata una tendenza all'aumento dell'appetito con conseguente aumento della frequenza dei pasti. Si è notata inoltre la riduzione delle vocalizzazioni, della ricerca delle femmine, dell'atteggiamento di minzione a spruzzo e del tipico odore pungente delle urine. In alcuni soggetti però non è stata osservata la soppressione di alcuni comportamenti tipici del gatto maschio adulto quali la marcatura del territorio e la monta delle gatte in calore.

# 1.INTRODUZIONE

Il controllo della riproduzione nella specie felina è un aspetto importante da prendere in considerazione sia per quanto riguarda gli animali domestici sia per gli animali semi-randagi. Il problema della sovracrescita delle colonie feline è di rilevante importanza a partire dal fatto che tale specie, essendo molto prolifica, può moltiplicare il suo numero esponenzialmente in poco tempo. Negli Stati Uniti per esempio il problema viene affrontato purtroppo anche mediante l'eutanasia di molti cani e gatti nei canili, in quanto il randagismo in questo paese è una condizione rilevante (Zawistowski et al. 1998). La Humane Society stima infatti che ogni anno tra gli 8 e i 10 milioni di cani e gatti entrano nei canili e 4-5 milioni di questi vengono sottoposti ad eutanasia con le relative implicazioni etiche.

La sovracrescita di una data specie porta al disequilibrio della fauna residente all'interno di un habitat ed inoltre involontariamente cani e gatti possono essere il serbatoio o il vettore di malattie trasmissibili agli uomini e alle specie domestiche di interesse economico. In Gran Bretagna, per esempio, i gatti randagi uccidono approssimativamente 100 milioni di uccelli e altri animali mammiferi ogni anno (May et al. 1988).

Per quanto riguarda gatti di colonia o semi-liberi, di norma la crescita demografica è tenuta sotto controllo tramite sterilizzazione chirurgica ma rimane una pratica che può risultare costosa e necessita di un anestesista, attrezzi chirurgici adeguati e che normalmente è poco remunerata, per cui spesso è difficile trovare veterinari disposti ad effettuare queste operazioni. C'è da aggiungere che, considerando la quantità di cani e gatti randagi di cui si desidera ottenere la sterilizzazione permanente, il metodo chirurgico può richiedere troppo tempo e può risultare troppo costoso visto che deve essere applicato su larga scala. Anche per gli animali da compagnia il metodo tradizionale di sterilizzazione è sicuramente l'intervento chirurgico: l'ovariectomia o l'ovaio-isterectomia nelle femmine e l'orchietomia nei maschi. Nonostante ciò non tutti i proprietari vogliono sottoporre il loro animale alla sterilizzazione chirurgica per vari motivi. Per prima cosa l'intenzione di far riprodurre il proprio animale sicuramente disincentiva i proprietari a scegliere questa opzione ma, anche per i soggetti non adibiti alla riproduzione, il proprietario potrebbe essere riluttante a considerare l'intervento chirurgico. In uno studio seguito a San Paolo in Brasile (Soto et al. 2005), per esempio, il 56,5% dei proprietari di animali adottati in canile erano contro la castrazione chirurgica per compassione (58,1%),

perché non ritenevano la procedura necessaria (11,4%), per i costi (9,5%) o per i cambiamenti comportamentali che ne derivano (4,8%). C'è da notare inoltre il fatto che la sterilizzazione chirurgica non è priva di inconvenienti e aspetti svantaggiosi:

- Rischio chirurgico generico: l'incidenza di complicazioni dovute a sterilizzazione nei piccoli animali oscilla tra il 7% ed il 27%.
- Incontinenza urinaria a causa della minore capacità dello sfintere uretrale esterno di mantenere la continenza dovuto al calo di estrogeni. L'incidenza è variabile dal 3 al 20% nelle cagne.
- Alopecia simmetrica (osservata solo nel cane).
- Vaginite cronica (rara ma riportata nella cagna, non osservata nel gatto).
- Comparsa dei sintomi del calore nel caso in cui rimanga un pezzo di tessuto ovarico dopo l'intervento. È una condizione rara ma è riportata sia nella cagna che nella gatta.
- Infezione del moncone uterino.
- Osteoporosi (non è considerato un problema rilevante nella cagna e nella gatta).
- Alterazioni comportamentali: è riportato di cagne dominanti che hanno peggiorato il loro comportamento dopo sterilizzazione.
- Aumento di peso. Tra gli effetti svantaggiosi della sterilizzazione chirurgica vi è anche l'obesità che è un problema rilevante nella specie felina per quanto riguarda la salute del soggetto essendo associata a molte condizioni patologiche quali il diabete mellito, la steatosi epatica ed altri tipi di patologie (Laflamme, 2006).

Dall'esigenza di evitare tutte queste evenienze sono stati sviluppati vari metodi di contraccezione farmacologica che non prevedessero l'intervento chirurgico. Tra questi troviamo i trattamenti ormonali con progestinici, androgeni, gli agonisti o antagonisti del GnRH (Gonadotropin releasing hormone) che agiscono sia bloccando direttamente gli eventi mediati dai recettori ormonali sia indirettamente con meccanismi di feedback negativo. È anche possibile l'immunocontraccezione mediante vaccinazione contro il GnRH, i recettori dell'LH (ormone luteinizzante) o le proteine della zona pellucida (Kutzler e Wood, 2006; Ball et al. 2006; Walker et al. 2007; Garcia et al. 2012). Quest'ultima opzione però ha avuto risultati discordanti in letteratura, principalmente dovuti alla necessità di usare un coadiuvante nella stimolazione dell'immunità. Anche le iniezioni intratesticolari o intraepididimali forniscono un metodo di sterilizzazione non chirurgica nel cane e nel gatto maschio ma con risultati insoddisfacenti. Altri metodi sono stati sviluppati come dispositivi intravaginali o intrauterini e ablazione testicolare mediante ultrasuoni, ma

finora senza molto successo.

Mentre per quanto riguarda il gatto domestico la gestione riproduttiva viene controllata quasi sempre mediante ovariectomia ed orchietomia, per quel che concerne il controllo della riproduzione dei felini selvatici tenuti negli zoo si richiede un metodo di sterilizzazione alternativo che sia sicuro e reversibile. L'obiettivo di conservazione di programmi riproduttivi nei felidi degli zoo è di mantenere almeno il 90% della diversità genetica all'interno di una specie per almeno i 100 anni successivi. A causa della limitatezza di spazio e risorse, i gestori degli zoo hanno richiesto un tipo di contraccezione che limiti la riproduzione dei soggetti geneticamente meno validi e che renda applicabile la conservazione dei piani di sopravvivenza della specie.

La contraccezione, come forma di controllo riproduttivo, sta aumentando i felidi selvatici in libertà e le colonie di gatti randagi dal momento che viene spesso preferita rispetto al metodo letale nel controllo della sovracrescita di queste popolazioni. Se fossero disponibili metodi contraccettivi sicuri, efficaci e pratici per i gatti domestici anche molti allevatori e proprietari li preferirebbero alla sterilizzazione chirurgica. La possibilità di garantire una totale reversibilità della condizione di sterilità sarebbe sicuramente vantaggiosa nei casi in cui il proprietario non volesse escludere l'eventuale utilizzo dell'animale come riproduttore nel futuro. Questo accade spesso nel caso di allevamenti in cui per un certo periodo si vuole mettere "a riposo" un soggetto riproduttore per qualsiasi motivo. Nonostante ciò non è ancora diffuso l'uso di metodi contraccettivi alternativi a causa di problemi che concernono l'aspetto della salute e la mancanza di scelte pratiche e attuabili.

La contraccezione, nel senso più ampio del termine, intende la prevenzione della nascita di prole mantenendo la potenziale fertilità del soggetto. Quest'obiettivo può essere ottenuto prevenendo la formazione di gameti, il concepimento, l'impianto o interrompendo la gravidanza. La ciclicità riproduttiva e la gametogenesi in entrambi i sessi può essere alterata dalla somministrazione di ormoni esogeni che interferiscono con il normale asse ipotalamo-ipofisi-gonade, prevenendo la sintesi, il rilascio ormonale o interferendo con l'attività endocrina a livello tissutale. Inoltre la spermatogenesi può essere direttamente bloccata mediante la somministrazione di alcuni farmaci.

I metodi di contraccezione nel gatto maschio possono essere classificati in quattro tipologie di meccanismi:

- contraccettivi che sopprimono l'istinto sessuale;
- contraccettivi chimici che arrestano direttamente la spermatogenesi;
- contraccettivi che bloccano la fuoriuscita di spermatozoi;

- contraccettivi che arrestano la spermatogenesi andando ad interferire con l'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo (analoghi del GnRH).

Per quanto riguarda la prima categoria ritroviamo i progestinici che sono stati considerati un'alternativa alla castrazione chirurgica sia nei gatti che nei cani in studi pregressi (Harris e Wolchuk 1963; Kutzler e Wood 2006). Nei gatti maschi sono stati usati principalmente per la soppressione dei comportamenti connessi all'attività sessuale come la ricerca delle femmine, gli accoppiamenti e la marcatura del territorio. Questo tipo di trattamento però, specialmente nel caso di uso prolungato, è riconosciuto indurre degli effetti collaterali gravi come l'iperplasia mammaria (fibroadenomatosi felina), tumori mammari e insulino-resistenza che può predisporre al diabete mellito sia la gatta che il maschio (Johnston et al. 2001). Inoltre non sono conosciuti gli effetti dei progestinici sulla qualità seminale ed è per questo che la loro azione è volta più che altro al trattamento dei comportamenti indesiderati.

Nella categoria dei contraccettivi chimici esistono alcuni farmaci quali il gossipolo, i dinitropioli e i carbammati che causano infertilità nel maschio mediante molteplici meccanismi (Zaneveld et al. 1987). Questi però presentano anche altri effetti tossici che li rendono inaccettabili come contraccettivi. I composti bisdiaminici, che agiscono come target sull'epitelio germinale nel maschio, sono un'eccezione e sembrano non avere effetti sistemici dannosi (Beyler et al. 1961). Uno studio nel gatto maschio ha dimostrato che 150 mg/Kg di bisdiamina (Fertilysin1, SAF Bulk Chemicals, Milwaukee, WI, USA) somministrata giornalmente con il cibo causava un arresto completo della spermatogenesi in tutti gli animali trattati senza aver rilevato danni agli spermatozoi (Munson et al. 2004). Gli effetti si sono rivelati completamente reversibili e non sono stati notati effetti avversi sulla salute, sui parametri degli esami del sangue o sul comportamento dei soggetti. Sebbene le bisdiamine sembrino sicure ed efficaci per i gatti maschi, possono indurre seri effetti teratogeni nelle femmine in gravidanza (Taleporos et al. 1978). Oltre a questa oggettiva limitazione del campo d'azione ai soli gatti maschi, un ulteriore aspetto limitante per questo approccio è il costo delle bisdiamine che al momento risulta proibitivo per l'uso in campo veterinario.

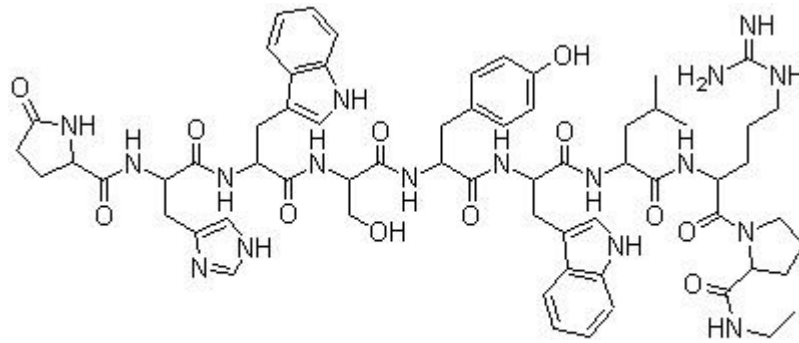
Per quanto riguarda i contraccettivi che bloccano la fuoriuscita degli spermatozoi, esistono dei dispositivi di silicone che servono per l'occlusione del dotto deferente che sono stati testati nei felidi come alternativa reversibile alla vasectomia (Munson, 2006). Nonostante venga bloccata la fuoriuscita degli spermatozoi però, avvengono delle reazioni



infiammatorie locali che rendono improbabile la reversibilità dell'effetto. Inoltre la necessità di effettuare un intervento di microchirurgia rende questa tecnica impraticabile.

Sono stati sintetizzati farmaci analoghi al GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone) che servono alla modulazione del rilascio ipofisario di FSH (follicle-stimulating hormone) e LH (luteinizing hormone) per motivi terapeutici. La modificazione della struttura decapeptidica del GnRH ha permesso di ottenere due tipi di analoghi: GnRH agonisti e GnRH antagonisti. La somministrazione dei GnRH antagonisti blocca completamente ed inibisce l'espressione genica dei recettori del GnRH portando ad una caduta immediata della secrezione di FSH e LH. Alcuni di questi però hanno portato al rilascio significativo di istamina che ne ha limitato molto l'uso. Più recentemente sono stati sviluppati alcuni antagonisti del GnRH che evitano questo effetto collaterale senza comprometterne la potenza. Nonostante ciò lo sviluppo e la diffusione di questi farmaci è stato rallentato molto a causa degli alti costi di produzione. Gli agonisti del GnRH, al contrario, hanno visto la loro diffusione per molti usi clinici negli animali, per esempio nel controllo della riproduzione sia nel ruolo pro che anti-fertilità. Questi attivano i recettori del GnRH causando l'ipersecrezione delle gonadotropine e il conseguente incremento delle concentrazioni degli ormoni sessuali nel sangue circolante ("flare effect"). Dopo l'iniziale effetto stimolante, dosi ripetute o il rilascio graduale del farmaco risultano in una downregulation dei recettori del GnRH a livello ipofisario e in un blocco del rilascio delle gonadotropine (FSH e LH) con conseguente soppressione della funzione riproduttiva (Trigg et al. 2001; Riesenbeck et al. 2002). Inoltre l'uso cronico degli agonisti del GnRH causa una desensibilizzazione delle cellule del Leydig all'LH nei cani (Junaidi et al. 2007). Sia la spermatogenesi che la produzione di testosterone dipendono dalla secrezione ipofisaria di LH e FSH che viene soppressa in presenza di concentrazioni persistentemente alte dell'agonista del GnRH.

È stato stimato che negli ultimi trent'anni sono stati sviluppati più di duemila analoghi del GnRH (Karten and Rivier, 1986). Lo sviluppo si è incentrato sulla produzione di molecole con un'alta affinità per i recettori del GnRH e aumentata resistenza alla degradazione e all'eliminazione. Questi "super-agonisti" si sono scoperti avere effetti anti-riproduttivi. Il deslorelin è classificato appunto come super-agonista con una potenza pari a circa 100 volte quella del GnRH. Rispetto a questo, il deslorelin presenta una variazione della struttura chimica del peptide negli amminoacidi posti a livello 6, 9 e 10. La sua composizione amminoacidica è la seguente: 5-oxo-L-prolyl-L-histidyl-L-tryptophyl-L-seryl-L-tyrosyl-D-tryptophyl-L-leucyl-L-arginyl-N-ethyl-L-prolinamide.



Pyr-His-Trp-Ser-Tyr-D-Trp-Leu-Arg-Pro-NH<sub>2</sub>

**Figura 1** Composizione amminoacidica del Deslorelin, un agonista del GnRH.

Il deslorelin è stato approvato inizialmente per l'uso nelle cavalle per indurre e sincronizzare le ovulazioni come impianto sottocutaneo a lento rilascio (Ovuplant®, Virbac). Anche per il cane è stato formulato un impianto sottocutaneo a lento rilascio dell'agonista del GnRH deslorelin (Suprelorin®, Virbac) e questo è stato registrato in Australia nel 2002 per la contraccezione nei cani maschi. Nell'Unione Europea l'impianto si è reso commercialmente disponibile a partire dal 2008.

Sebbene sia approvato solo per la contraccezione reversibile e per il controllo delle patologie nel cane maschio il deslorelin (Suprelorin®, Virbac) è stato usato off-label per vari aspetti. Questo trattamento si è rivelato un'alternativa efficace e reversibile alla castrazione chirurgica in varie specie tra cui il cane, il gatto (Munson et al. 2001; Rubion e Driancourt 2009), il furetto (Schoemaker et al. 2008; Prohácik et al. 2010) e varie specie esotiche (Bertschinger et al. 2001; Herbert et al. 2005). Il beneficio nella pratica clinica è dovuto sia al così detto "flare effect" (risposta immediata) sia alla down regulation (risposta cronica) dei recettori del GnRH. Le applicazioni cliniche nei cani e nei gatti includono:

- contraccezione,
- induzione dell'estro,
- trattamento dell'iperplasia prostatica benigna,
- trattamento dell'incontinenza urinaria post-sterilizzazione,
- trattamento dei problemi comportamentali associati agli ormoni sessuali.

Questo farmaco potrebbe avere utili applicazioni anche nel controllo della riproduzione sia per gatti semirandagi sia nel caso di gatti di compagnia. Per i rifugi ed altre strutture che svolgono un'azione di controllo e protezione sugli animali, un trattamento in grado di rendere i gatti sterili con una sola applicazione risulterebbe oltremodo conveniente. Anche

nel caso di proprietari di gatti il costo e la durata del trattamento con deslorelin potrebbero essere due aspetti vantaggiosi rispetto all'intervento chirurgico. Oltre a ciò il controllo riproduttivo potrebbe essere effettuato in modo ottimale anche nei soggetti ad alto rischio per l'anestesia o in quei gatti il cui proprietario non vuole escludere una vita riproduttiva futura. L'utilizzo del deslorelin potrebbe anche essere volto alla riduzione di particolari aspetti comportamentali sgraditi al proprietario. Nel gatto maschio, infatti, comportamenti quali l'eliminazione di urina in posti inappropriati, la minzione a spruzzo e il caratteristico odore pungente dell'urina sono tutti tipici aspetti legati alla presenza del testosterone (Aggugini et al. 1998). L'aspetto etologico è di rilevante importanza anche in relazione all'aggressività verso conspecifici, in quanto per il controllo del territorio e per la conquista delle femmine spesso i gatti maschi riportano ferite che possono favorire la trasmissione di malattie quali FIV (feline immunodeficiency virus) e FeLV (feline leukemia virus). Il testosterone gioca un ruolo chiave nella genesi dei comportamenti legati all'aggressività in quanto è stato correlato all'inibizione del rilascio di serotonina, alla diminuzione dei recettori inibitori GABA<sub>A</sub> e alla soppressione del turnover della dopamina (Simpson et al. 2001), tutti eventi che portano ad un aumento di tale aspetto comportamentale. L'impianto sottocutaneo di deslorelin, riducendo la testosteronemia, induce anche una riduzione degli atteggiamenti legati all'attività sessuale e all'aggressività tra conspecifici come si è visto da recenti studi (Romagnoli et al. 2011; Goericke-Petsch et al. 2011). Relativamente all'uso del deslorelin nel gatto maschio in letteratura i dati sono scarsi e sono limitati all'uso dell'impianto da 4.7 mg (Romagnoli et al. 2010; Goericke-Pesch et al. 2011; Novotny et al. 2012).

## **1.1 CENNI DI FISILOGIA RIPRODUTTIVA DEL GATTO MASCHIO**

### **CONTROLLO ORMONALE DELL'APPARATO RIPRODUTTIVO NEL MASCHIO**

La fisiologia riproduttiva nel maschio è controllata endocrinologicamente da due gonadotropine: l'LH (Luteinizing Hormone) e l'FSH (Follicle-Stimulating Hormone) secrete dall'ipofisi anteriore. Il rilascio delle gonadotropine è sotto il controllo positivo del GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), che viene rilasciato dall'ipotalamo. Il GnRH è a sua volta regolato mediante controllo negativo dal testosterone, dagli estrogeni e dal diidrotestosterone. Il feedback negativo avviene a due livelli: sia a livello ipotalamico che a livello ipofisario. Questo sistema di regolazione ormonale permette le comunicazioni tra

ipotalamo, ipofisi anteriore e testicolo. Esiste inoltre un ulteriore fattore inibitorio, chiamato inibina, responsabile del controllo della secrezione ipofisaria dell'FSH. Potrebbero esistere anche delle altre molecole prodotte dalle cellule del Sertoli che agiscono nel senso opposto (activine).

La produzione di testosterone nel maschio è data dalle cellule del Leydig a livello testicolare. Queste rispondono all'ormone LH rilasciato dall'ipofisi, che è coinvolto nella regolazione della produzione di testosterone. Tale regolazione è mediata dai recettori dell'LH presente a livello di membrana plasmatica delle cellule del Leydig. La quantità di tali recettori è regolata da vari ormoni come lo stesso LH, l'FSH, la prolattina e il cortisolo. Per quanto riguarda l'FSH e la prolattina la regolazione della produzione di testosterone avviene nel senso dell'incremento, mentre il cortisolo induce l'inibizione della produzione di testosterone.

Riferendoci alle concentrazioni di LH e testosterone nel sangue, l'andamento è di tipo pulsatile durante la giornata. Per la valutazione della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo è dunque necessaria una stimolazione mediante somministrazione di GnRH sistemico e la valutazione ad un ora di distanza dell'innalzamento del testosterone. Normalmente la secrezione ipotalamica di GnRH determina la secrezione a livello ipofisario delle gonadotropine (LH e FSH). L'LH a sua volta stimola la liberazione di testosterone dalle cellule del Leydig a livello testicolare, mentre l'FSH induce la liberazione da parte delle cellule del Sertoli dell'ABP (proteina legante gli androgeni), del DHT (diidrotestosterone) e degli estrogeni. Queste molecole vanno a loro volta ad intervenire a livello ipotalamico inducendo un meccanismo di feedback negativo sulla liberazione di GnRH e di inibina, che determina l'inibizione principalmente a livello ipofisario della liberazione di FSH.

La concentrazione di testosterone è più elevata a livello testicolare rispetto al circolo periferico in quanto le cellule del Sertoli, stimulate dall'FSH, sintetizzano la proteina legante gli androgeni (ABP) che mantiene elevata questa concentrazione nei tubuli. Il testosterone presenta un'emivita media di 10-20 minuti, viene degradato a livello epatico ed eliminato quasi esclusivamente con le urine. La spermatogenesi a livello testicolare è mantenuta grazie al testosterone, in quanto agisce nella maturazione e differenziazione degli spermatozoi. Il testosterone circolante è importante anche per il mantenimento delle caratteristiche sessuali secondarie, per il comportamento sessuale e per il controllo del feedback negativo della secrezione delle gonadotropine. L'FSH agisce a livello di tubuli seminiferi insieme al testosterone endogeno stimolando le cellule del Sertoli a supportare

le cellule germinali. Questo meccanismo favorisce la spermatogenesi, in particolare nello sviluppo degli spermatozoi. I recettori dell'FSH sono presenti sulle cellule del Sertoli e probabilmente anche sugli spermatogoni all'interno dei tubuli seminiferi. L'FSH stimola la spermatogenesi indirettamente andando ad agire sulle cellule del Sertoli, che forniscono l'ambiente necessario per lo sviluppo delle cellule germinali. Il normale funzionamento delle cellule del Sertoli dipende anche dalle concentrazioni di testosterone. Le loro funzioni sono varie e dipendono dallo stadio di sviluppo delle cellule germinali a cui sono associate, in quanto secernono sostanze responsabili del controllo della steroidogenesi e della spermatogenesi.

La secrezione dell'LH nel gatto maschio oscilla in un range che va da 3 a 29 ng/ml. Il rilascio pulsatile del testosterone si è visto che varia da 0,1 a 3,3 ng/ml. La somministrazione esogena di GnRH permette di testare il rilascio ipofisario di LH e conseguentemente il rilascio testicolare di testosterone. Nei gatti maschi interi la somministrazione di GnRH causa un incremento dell'LH dopo 30 minuti e l'aumento del testosterone dopo 60 minuti.

## SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è la somma delle trasformazioni che risultano nella formazione degli spermatozoi a partire dagli spermatogoni. Questo processo è suddiviso in varie fasi:

### 1. SPERMATOCITOGENESI

Inizialmente gli spermatogoni localizzati lungo la membrana basale dei tubuli seminiferi si moltiplicano per mitosi. La spermatocitogenesi permette sia la produzione ciclica di spermatociti primari sia di mantenere il numero di cellule staminali. Il resto del processo avviene nel compartimento luminale dove gli spermatociti primari vengono sottoposti ad un processo di meiosi che produce gli spermatociti secondari. Questi ultimi attuano a loro volta la divisione meiotica per produrre gli spermatozoi.

## 2. SPERMIOGENESI

La trasformazione morfologica finale viene chiamata spermiogenesi e comporta la differenziazione degli spermatidi sferici in spermatidi maturi che verranno rilasciati all'interno del lume dei tubuli seminiferi come spermatozoi.

## 3. SPERMIAZIONE

Il processo che coinvolge il rilascio delle cellule germinali all'interno del lume dei tubuli dopo spermatocitogenesi e spermiogenesi viene chiamato spermiiazione. Le cellule del Sertoli sono associate alle cellule germinali durante il loro sviluppo. Il loro ruolo nella spermatogenesi include il fornire supporto e nutrizione, fagocitare i prodotti di scarto e secernere fluidi luminali. Anche le cellule del Leydig hanno un ruolo nel supportare la spermatogenesi. Il compartimento delle cellule interstiziali circonda i tubuli seminiferi i quali vengono bagnati da un fluido ricco in testosterone. Inoltre le cellule mioidi che formano il tessuto di sostegno aiutano il movimento propulsivo degli spermatozoi e del fluido all'interno dei tubuli seminiferi. Il tipo di cellula germinale, la sua morfologia e lo stadio di sviluppo portano ad avere un pattern a strati dell'epitelio germinativo. Ogni strato contiene le cellule di una generazione differente di cellule germinali che diventano man mano più differenziate più ci si avvicina al lume dei tubuli.

## 4. TRASPORTO EPIDIDIMALE, MATURAZIONE E STOCCAGGIO

Dai tubuli seminiferi gli spermatozoi passano attraverso la rete testis e i vasi efferenti all'interno dell'epididimo. Qui vengono sottoposti all'ultimo stadio maturativo: acquisiscono la capacità di muoversi, avvengono cambiamenti della membrana citoplasmatica e viene persa la goccia citoplasmatica. Gli spermatozoi maturi vengono quindi stoccati a livello di coda dell'epididimo. Al momento dell'eiaculazione questi passano nei dotti deferenti e vengono aggiunte varie secrezioni dalle ghiandole accessorie. Le ghiandole accessorie più importanti nel cane e nel gatto sono la prostata e le ghiandole bulbo uretrali. Ulteriori cambiamenti degli spermatozoi avvengono nel tratto genitale femminile con la capacitazione e la reazione acrosomiale rendendo possibile la fertilizzazione dell'oocita.

Dalla bibliografia si evince che nel gatto maschio gli spermatozoi sono presenti all'interno dei tubuli seminiferi per tutta la durata dell'anno (Johnston et al, 2001) anche se le concentrazioni degli ormoni sessuali e la qualità seminale sembrano essere influenzate dalla stagione riproduttiva delle gatte femmine (Tsutsui et al. 2009). La durata della spermatogenesi nel gatto maschio è pari a 47 giorni (Franca et al. 2003): dopo questo periodo tutti gli spermatozoi della stessa generazione vengono simultaneamente rilasciati all'interno dell'epididimo. Il transito epididimale non è stato ancora stimato nel gatto ma nelle altre specie è generalmente di 10-12 giorni (Orgebin-crist et al 1965, Courot et al 1981).

## **1.2 SCOPO DELLA TESI**

Lo studio si propone di indagare l'efficacia dell'impianto sottocutaneo a lento rilascio dell'analogo del GnRH deslorelin ad un dosaggio di 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) nella soppressione dell'attività riproduttiva nel gatto maschio. Gatti maschi trattati con un impianto da 4.7 mg di deslorelin diventano sterili e cessano la loro attività riproduttiva e il loro comportamento tipico di vagabondaggio nel giro di 4-6 settimane. Questo blocco dell'attività riproduttiva nei gatti maschi dura 12-15 mesi (Romagnoli et al. 2010). Una dose doppia del farmaco potrebbe quindi portare ad aumentare fino 24-36 mesi la durata della sterilità nei gatti maschi. Lo scopo della tesi è quindi di valutare il tempo necessario all'instaurarsi dell'effetto del farmaco oltre che la durata d'azione dello stesso. Più precisamente si vuole verificare l'effetto di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo mediante rilevamento delle concentrazioni di testosterone in circolo, misurazione delle dimensioni testicolari ed evidenza dei caratteri sessuali secondari. L'ipotesi di partenza è che, ad un primo effetto stimolatorio del farmaco, segua una fase cronica data dalla downregulation dei recettori del GnRH che porti alla caduta delle concentrazioni sieriche di testosterone, mimando così la condizione ormonale del soggetto castrato.

Mediante somministrazione di un agonista del GnRH, la Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet), si vuole indurre la stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo per verificare la funzionalità testicolare. La via di somministrazione endovenosa è la via normalmente utilizzata per questo tipo di test, tuttavia nel nostro studio si è voluto paragonare questa via a quella intramuscolare. Nel momento in cui non si evidenziassero differenze tra le due vie di somministrazione, quella intramuscolare rappresenterebbe sicuramente la modalità più semplice e pratica da preferire o da usare come valida alternativa a quella

endovenosa. Questo studio ha anche lo scopo di indagare eventuali cambiamenti del peso dei soggetti trattati per verificare se vi sono variazioni paragonabili a quelle determinate dall'orchietomia.

In letteratura non vi sono dati riguardanti la produzione spermatica e le variazioni della qualità seminale nei gatti dopo trattamento con deslorelin. In questo studio si vuole appunto approfondire questi aspetti in quanto sarebbe di grande utilità verificare l'intervallo medio di tempo necessario all'ottenimento della condizione di sterilità dopo l'impianto. Questo ci permetterebbe di dare utili informazioni qualora il proprietario volesse tenere il soggetto trattato insieme a gatte in estro senza doversi preoccupare di gravidanze indesiderate.

Ad integrazione dell'aspetto clinico e riproduttivo, mediante l'utilizzo di questionari, si vuole ottenere alcune informazioni relative al comportamento degli animali trattati per trarre delle valutazioni generali sui possibili cambiamenti post-trattamento riguardanti l'aspetto etologico.

L'impianto verrà localizzato per metà soggetti a livello interscapolare e per metà a livello ombelicale. Il sito d'impianto normalmente utilizzato è quello interscapolare, ma la localizzazione ombelicale è stata già utilizzata in alcuni cani nello studio di Fontaine et al. (2011): non sono stati evidenziati effetti indesiderati ed è stato sottolineato il vantaggio che in questa sede l'impianto, se necessario, può essere rimosso facilmente. Il nostro studio dunque ha anche lo scopo di paragonare queste due localizzazioni d'impianto per verificare la reale sovrapposibilità d'effetto anche nei gatti maschi.



## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 ANIMALI COINVOLTI NELLA RICERCA

Lo studio è stato condotto su 12 gatti maschi interi post-puberi, tutti maggiori di 6 mesi d'età (range da 6 mesi a 5 anni d'età). Il gruppo in questione è risultato eterogeneo come età, peso, abitudini e luogo di provenienza (Tab 1). Per quanto riguarda la razza, la maggior parte dei soggetti è Comune Europeo, un gatto Sacro di Birmania (Petronio, soggetto 11) ed un incrocio tra un Comune Europeo ed un Angora Turco (Porthos, soggetto 10). I soggetti non sono tutti regolarmente vaccinati, in quanto la maggior parte sono gatti semirandagi che vivono dentro e fuori casa; così come la terapia antiparassitaria di routine è stata effettuata regolarmente solo in due dei dodici gatti. Quasi tutti i soggetti vivono sia dentro che fuori casa con l'eccezione di Petronio (soggetto 11), che fa parte di un allevamento di razza Sacro di Birmania, e di Porthos (soggetto 10): questi due soggetti infatti vivono esclusivamente all'interno delle relative abitazioni. Tutti i gatti in questione convivono con altri animali: Golia (sogg. N° 12) è l'unico soggetto che non convive con altri gatti ma con altre specie di animali (un cane e una cocorita), Porthos (sogg. N° 10) convive solo con gatti maschi, Nerone (sogg. N°2) convive solo con gatte femmine, tutti gli altri soggetti convivono con altri gatti di entrambi i sessi.

L'alimentazione è di tipo misto commerciale (secco e umido) per tutti i soggetti e in alcuni casi è associata a cibi casalinghi. La frequenza dei pasti varia da una a tre volte al giorno e in alcuni casi il gatto ha sempre a disposizione una ciotola con le crocchette.

All'interno del gruppo di gatti preso in considerazione alcuni soggetti sono imparentati tra loro o comunque appartengono allo stesso proprietario. Più di preciso i soggetti 3 e 4 (Micio1 e Micio2) sono fratelli e convivono, così come i soggetti 8 e 9 (Zeus e Attila). Anche i soggetti 5, 6 e 7 (Aldo, Pepe e Tom) convivono ma non hanno rapporti di parentela tra loro.

Per quasi tutti i soggetti il proprietario è stato in grado di identificare il momento in cui il gatto è diventato pubere e questo periodo variava da 8 a 12 mesi d'età. Molti soggetti, infatti, al momento della prima visita presentavano già comportamenti tipici del gatto maschio adulto quali marcatura del territorio con urina odorosa, minzione a spruzzo, tendenza al vagabondaggio, interesse per le femmine e comportamenti di monta. Per quattro soggetti (3, 4, 5, 10) invece il proprietario non aveva notato particolari cambiamenti nel comportamento riguardanti l'attività riproduttiva, pensando che dovessero ancora

entrare nel periodo della pubertà. Questa considerazione è stata poi smentita dall'evidenziazione delle spicole cornee a livello di mucosa peniena, tipico carattere sessuale secondario nel gatto maschio post-pubere. Alcuni soggetti (6, 7, 11) alla prima visita erano sicuramente attivi sessualmente ed avevano avuto anche alcune cucciolate. Per quanto riguarda il soggetto 11 (Petronio, il gatto dell'allevamento sacro di Birmania), per esempio, nella sua vita ha avuto otto accoppiamenti con risultanti tre cucciolate: la prima con 2 cuccioli, la seconda con tre cuccioli, e la terza con quattro cuccioli. Nella tabella sottostante (Tab.1) vengono riportati i dati relativi al segnalamento, al periodo in cui è stato inserito l'impianto ed il periodo di follow up dei gatti introdotti nello studio.

NUMERO	NOME	RAZZA	Età	PESO (kg)	PERIODO IMPIANTO	FOLLOW UP
1	SILVESTRO	Comune Europeo	6 mesi	3	Novembre 2011	13 mesi
2	NERONE	Comune Europeo	4 anni	5,8	Dicembre 2011	9 mesi
3	MICIO 1	Comune Europeo	8 mesi	4,6	Gennaio 2012	40 giorni
4	MICIO 2	Comune Europeo	8 mesi	4,7	Gennaio 2012	8 mesi
5	ALDO	Comune Europeo	9 mesi	4,1	Gennaio 2012	40 giorni
6	PEPE	Comune Europeo	5 anni	4,7	Gennaio 2012	8 mesi
7	TOM	Comune Europeo	5 anni	5,5	Febbraio 2012	8 mesi
8	ZEUS	Comune Europeo	9 mesi	3,5	Febbraio 2012	10 mesi
9	ATTILA	Comune Europeo	9 mesi	3,6	Febbraio 2012	10 mesi
10	PORTHOS	Incrocio tra C. E. e Angora Turco	8 mesi	3,2	Febbraio 2012	11 mesi
11	PETRONIO	Sacro di Birmania	3 anni	4	Marzo 2012	10 mesi
12	GOLIA	Comune Europeo	2 anni	4,3	Maggio 2012	6 mesi

**Tab.1** Segnalamento (numero, nome, razza, età, peso, data dell'impianto e periodo di follow up) di ciascun gatto trattato con un impianto di Deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). I dati della tabella riportano numero, nome di riferimento del gatto, razza, età, peso (Kg), periodo in cui è stato effettuato l'impianto e durata del monitoraggio (follow up).

Il progetto di ricerca è cominciato nell'ottobre 2011 quando il primo gatto è stato sottoposto ad impianto con deslorelin, poi sono stati reclutati gli altri 11 gatti nei mesi successivi. L'ultimo gatto è stato reclutato nel maggio 2012. Tutti i gatti sono stati seguiti per un periodo variabile da 40 giorni a 13 mesi (media del follow up di 8 mesi dall'impianto). In due casi non è stato possibile rivedere i soggetti oltre la seconda visita (40 giorni

dall'impianto) in quanto i proprietari hanno riferito che i gatti in questione non sono più tornati a casa. Questo è successo per Aldo (sogg. N° 5) e per Micio 1 (sogg. N° 3).

Il soggetto 11 (Petronio) è stato castrato chirurgicamente a 348 giorni dall'impianto (11 mesi) in quanto, nonostante un primo periodo in cui vi era stato un effetto sul comportamento del gatto, che era diventato più sedentario e meno attivo verso le femmine, nell'ultimo periodo di follow up si è notato un aumento della marcatura del territorio e alcuni tentativi di monta di gatte che erano entrate nel periodo del calore.

## **2.2 PROTOCOLLO SPERIMENTALE**

Il protocollo sperimentale ha previsto per la prima visita:

- Esame clinico generale e riproduttivo
- Primo prelievo di sangue
- Somministrazione di GnRH
- Prelievo di seme
- Secondo prelievo di sangue
- Impianto di Deslorelin
- Questionario al proprietario

### **A. ESAME CLINICO GENERALE E RIPRODUTTIVO:**

Alla prima visita ogni gatto è stato identificato mediante segnalamento (razza, sesso, età, peso ecc.), anamnesi ambientale, individuale e riproduttiva. È stato fatto firmare al proprietario del gatto un consenso informato dopo aver spiegato accuratamente tutte le procedure previste dal protocollo. Lo scopo principale della prima visita è stato di valutare le condizioni di salute, documentare possibili patologie attuali o pregresse e determinare lo stato riproduttivo del soggetto (pre o post-pubere). L'animale è stato pesato ed è stato effettuato un esame obiettivo generale prendendo in considerazione:

- Sviluppo scheletrico e costituzione
- Stato di nutrizione e tonicità muscolare
- Stato del sensorio

- Segni ed atteggiamenti particolari
- Cute e sottocute
- Mucose apparenti
- Linfonodi esplorabili
- Temperatura
- Polso
- Respiro
- Grandi funzioni organiche

L'esame riproduttivo ha compreso l'ispezione e palpazione dei testicoli per la valutazione della loro presenza, simmetria e dimensioni mediante misurazione con calibro. Sono state infatti misurate lunghezza e spessore testicolari rispettivamente nell'asse maggiore e minore dell'organo per poi valutare empiricamente il volume testicolare. Questo è stato calcolato mediante una formula matematica relativa al volume di un elissoide considerando 3 misurazioni: lunghezza, spessore ed altezza. Avendo preso solo due misurazioni testicolari relative all'asse maggiore e minore, lo spessore e l'altezza sono stati considerati come lo stesso dato. La formula del volume dell'elissoide che è stata utilizzata è la seguente:  $l \times w \times h \times 0,5236$  (dove l è la lunghezza, w lo spessore ed h l'altezza) (Gouletsou et al 2008). È stato inoltre ispezionato il pene per la valutazione della sfoderabilità dal prepuzio e l'evidenziazione delle spicole peniene per la verifica dello stato post-pubere del soggetto.

#### B. PRIMO PRELIEVO DI SANGUE:

È stato effettuato un primo prelievo di sangue per dosare il testosterone basale prima del test di stimolo con il GnRH e per eseguire l'esame emocromocitometrico e biochimico completo. Quest'ultimo poi è stato ripetuto a distanza di 6 mesi o quando ne è sembrato opportuno per escludere ogni possibile problema degli animali trattati.

La sede del prelievo è stata quasi sempre a livello giugulare dopo tricotomia e disinfezione con Betadine® e alcool. L'animale è stato posto in decubito sternale o laterale con collo tenuto disteso. Dopo aver effettuato la compressione della vena a monte, è stato infisso l'ago 22G con la siringa PIC® Indolor da 2.5 ml 0.70x30 mm

ed è stato eseguito il prelievo . Nel caso di mancata riuscita dalla vena giugulare, il prelievo è stato eseguito in altre sedi come dalla vena cefalica o safena. In questo caso ci si è muniti di un ago butterfly PIC® Indolor da 0.80x19 mm o ago 21 G per il minor diametro di queste vene.

Il campione di sangue prelevato è stato circa di 2-4 ml ed è stato raccolto in 2 provette: una provetta senza anticoagulante per il campione destinato alla centrifugazione e stoccaggio del siero necessario per l'esame biochimico e per il dosaggio del testosterone, ed una provetta Vacutainer con EDTA per l'esame emocromocitometrico senza striscio. La provetta senza anticoagulante è stata mantenuta in posizione verticale per circa 15 minuti per favorire la coagulazione del campione. Successivamente il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 3500 giri per la sedimentazione del coagulo. È stata poi prelevata la fase liquida del campione e stoccata in una provetta eppendorf da 1,5 ml dove sono stati trascritti il nome del gatto, il nome del proprietario, la data del prelievo e se il prelievo era avvenuto prima o dopo lo stimolo con l'agonista del GnRH. Tutti i campioni sono poi stati stoccati in congelatore ad una temperatura di -20°C fino al momento del dosaggio del testosterone.

Si è usato l'analizzatore Immulite (DPC Diagnostic Product Corporation, LA, USA): questo analizzatore è uno strumento che serve all'esecuzione di immunodosaggi in chemiluminescenza. Vi è una provetta adeguatamente conformata che ruota intorno al suo asse longitudinale con una sferetta al suo interno che, grazie alla forza centrifuga data dalla rotazione, effettua dei lavaggi veloci e precisi. All'interno della provetta la sferetta è di polistirene rivestita con l'anticorpo specifico per il testosterone e costituisce la fase solida. Nella provetta avviene la reazione immunologica tra l'anticorpo e l'ormone, il lavaggio e lo sviluppo del segnale. Il coniugato dell'enzima legato alla sferetta porta alla formazione di un substrato chemiluminescente la cui emissione di luce è direttamente proporzionale alla quantità di testosterone originariamente presente nel campione di siero. Le provette di reazione (che vengono identificate con dei codici a barre) sono intervallate da piccoli calici all'interno dei quali viene posto il siero: questa combinazione costituisce una piattaforma a catena su cui viene effettuata l'operazione di dosaggio. L'analizzatore legge i codici a barre delle provette che successivamente passano al carosello d'incubazione. Mediante una pipettatrice il campione viene immesso nella provetta di reazione insieme ad un reagente marcato: la provetta

così caricata viene incubata ed agitata per un ora a 37°C. Dopo il periodo d'incubazione avviene la separazione del substrato legato da quello libero all'interno della stazione di lavaggio-centrifugazione ad alta velocità; dopodiché il liquido viene espulso in una camera laterale. Le provette vengono uniformemente processate eseguendo più lavaggi in pochi secondi che permettono di lasciare la sferetta senza residui. Il substrato mediante cui viene quantificato il legato marcato è il dioxetano e la quantificazione è resa possibile mediante un luminometro. Le provette vengono infatti poste all'interno del luminometro dove vengono fatte incubare per 10 minuti a 37°C. Durante il periodo d'incubazione avviene l'idrolizzazione del dioxetano grazie all'enzima fosfatasi alcalina. Alla fine di tale reazione si ha la produzione massima di emissione luminosa. Un tubo fotomoltiplicatore consente la misurazione dell'entità dell'emissione luminosa tramite il conteggio dei fotoni. Queste letture vengono comparate a curve standard e da questa comparazione si ricava la concentrazione dell'analita nel siero.

### C. TEST DI STIMOLO CON GnRH:

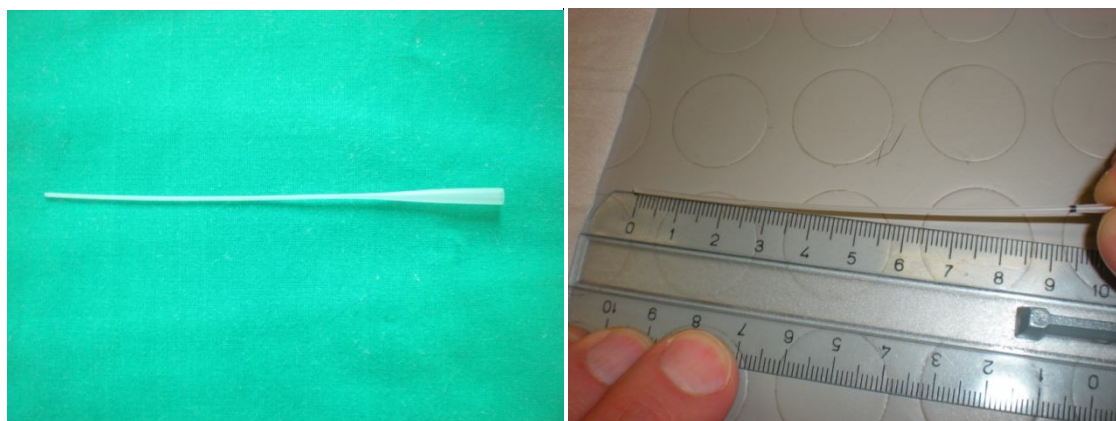
La somministrazione di GnRH è stata effettuata per il test di stimolo dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo ed ulteriore prelievo di sangue dopo un'ora per il dosaggio della testosteronemia. Grazie alla somministrazione di GnRH è possibile infatti determinare la normale funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo. Normalmente nei soggetti maschi interi a tale somministrazione dovrebbe seguire un picco di testosterone (Johnstone et al, 1996). La quantità utilizzata corrisponde a 50 mcg di Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet) tramite siringa da 1 ml tipo PIC® Indolor con ago da 22 G e la via di somministrazione è stata per metà gatti intramuscolare e per metà endovenosa. Quest'ultima rappresenta la via normalmente utilizzata per questo tipo di test, tuttavia l'abbiamo alternata alla via intramuscolare per rilevare eventuali differenze nella stimolazione dell'asse ipotalamo ipofisi. Questo perché, evidenziando l'equivalenza delle due vie, si potrebbe preferire ed usare come alternativa la via intramuscolare per la sua maggiore rapidità e facilità d'esecuzione, oltre che per ridurre lo stress dell'animale. Nel caso di somministrazione EV è stato applicato un catetere endovenoso nella vena cefalica del braccio. I gatti sono stati tenuti in decubito sternale, è stata tricotomizzata una parte dell'avambraccio ed è stata disinfettata con Betadine® e

alcool. Il catetere è stato inserito dopo aver compresso la vena a monte e, una volta visualizzato il sangue all'interno di esso, è stato fatto scivolare nella vena, si è tolto il mandrino, si è chiuso con una tappo perforabile ed è stato fissato all'arto con del cerotto. Subito dopo la collocazione dell'ago cannula è stata iniettata una piccola quantità di soluzione eparinata per evitare la coagulazione del sangue all'interno del catetere.

#### D. PRELIEVO DI SEME:

Per il prelievo di seme è stato necessario l'aiuto di un anestesista, in quanto per questa procedura l'animale è stato sedato con 100 mcg/kg di Medetomidina per via intramuscolare. Questa procedura (Zambelli et al, 2008) prevede la stimolazione dei recettori alfa2 adrenergici che permette il rilascio di una piccola quantità di materiale seminale altamente concentrato dalla coda dell'epididimo a livello di uretra.

Dopo circa 10-15 minuti dall'iniezione è stato inserito un catetere urinario 3-Fr per 9 cm all'interno dell'uretra per prelevare il materiale seminale. È stato utilizzato un modello di catetere da 14 cm open-end senza le aperture laterali per migliorare la raccolta del materiale seminale (Argyle™, Covidien Ilc, Mansfield, USA).



**Figura 2.** Catetere urinario open-end (Argyle™ Covidien Ilc Mansfield USA) utilizzato per il prelievo di seme mediante somministrazione di medetomidina e cateterizzazione uretrale. Per la procedura è stato segnato il catetere a 9 cm dall'apertura distale per identificare il punto in cui interrompere l'avanzamento per non entrare in vescica.

Il catetere è stato segnato con un pennarello indelebile a 9 cm di distanza dall'apertura distale prima dell'inserimento all'interno dell'uretra per identificare il punto in cui interrompere l'entrata del catetere. In questo modo non si rischia di oltrepassare lo sfintere vescicale e prelevare urina. Per l'inserimento del catetere è

stato estroflesso il pene e, dopo aver bagnato la punta del pene con alcune gocce di soluzione fisiologica per lubrificare l'entrata dell'uretra, è stato inserito il catetere senza mandrino così che il materiale seminale presente in uretra passasse per capillarità nel catetere.



**Figura 3.** Procedura di prelievo di seme mediante somministrazione di medetomidina e cateterizzazione uretrale.

Durante tutta la procedura il gatto è stato monitorato costantemente mediante rilevazione di frequenza respiratoria, frequenza cardiaca e temperatura ed alla fine è stato risvegliato mediante la somministrazione intramuscolare di atipamezolo (Antisedan®, Pfizer), un antagonista selettivo degli alfa2 agonisti (la dose è pari alla metà della dose di medetomidina).

All'estrazione del catetere è stata misurata la porzione contenente seme ed il materiale seminale è stato spinto in una provetta eppendorf da 1 ml mediante una siringa senza ago connessa al catetere stesso. Se la quantità di materiale seminale prelevato era troppo scarsa è stato posto direttamente sulla superficie del vetrino per la sua successiva valutazione. Il volume prelevato è stato stimato mediante una pipettatrice graduata da 20 mcl.



**Figura 4.** Stima del volume di eiaculato prelevato mediante pipettatrice graduata ed esecuzione del vetrino per valutazione della motilità e morfologia degli spermatozoi.



La stima della motilità progressiva è stata effettuata su una porzione di circa 5 mcl di seme: è stata deposta una goccia di materiale seminale ad una estremità del vetrino precedentemente riscaldato tenendolo a contatto con la cute dell'operatore ed è poi stata valutata la percentuale di spermatozoi progressivamente motili al microscopio ottico ad un ingrandimento di 10x. Sullo stesso vetrino è stata deposta una goccia di diluente PBS (phosphate buffered saline: 0,0036 g di piruvato di Na, 0,1g di glucosio, 0,0066 g di penicillina, 0,01g streptomicina, PH di 7,4 e Osmolarità di 278 mOsm) per poi eseguire con l'ausilio di un altro vetrino lo striscio del materiale seminale necessario alla valutazione della morfologia. Questa è stata effettuata mediante l'osservazione di 100 spermatozoi al microscopio ottico con ingrandimento 60x dello striscio di seme precedentemente colorato con Diff Quik. La colorazione ha previsto l'immersione del vetrino prima in un fissativo poi in due coloranti (eosina ed ematossilina) per due minuti e mezzo ciascuno. Dopo aver lavato l'eccesso del colore si è lasciato asciugare all'aria.

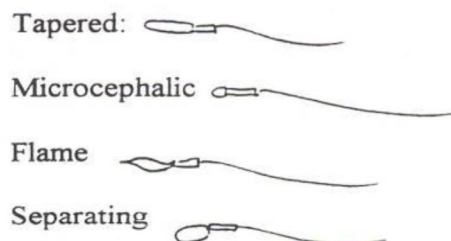
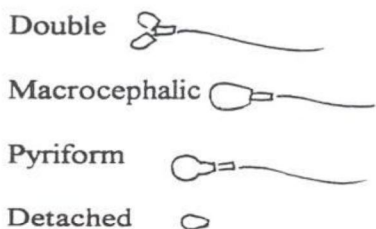


**Figura 5.** Colorazione di un vetrino di striscio di seme con colorante Diff Quik per la successiva valutazione morfologica degli spermatozoi.

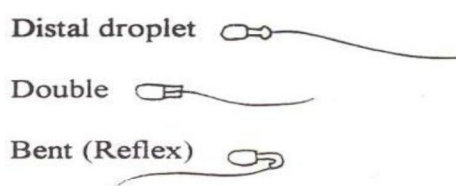
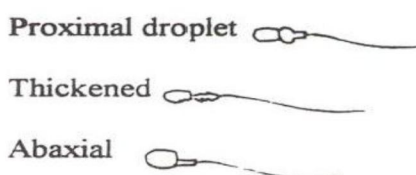
Sul vetrino sono state evidenziate le principali anomalie morfologiche valutando su 100 spermatozoi:

- % spermatozoi con anomalie morfologiche;
- % teste staccate;
- % spermatozoi con anomalie della testa includendo spermatozoi macrocefali, microcefali, con teste doppie, teste allungate, teste piriformi ecc.
- % spermatozoi con anomalie del collo tra cui collo doppio, assenza del collo, collo piegato ecc.
- % spermatozoi con anomalie della coda come coda arrotolata prossimale o distale, coda doppia, coda ripiegata, coda spezzata ecc.
- % spermatozoi con goccia citoplasmatica prossimale o distale.

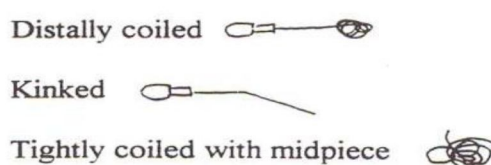
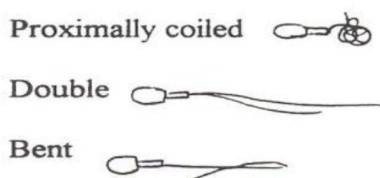
### Head Abnormalities:



### Midpiece Abnormalities:



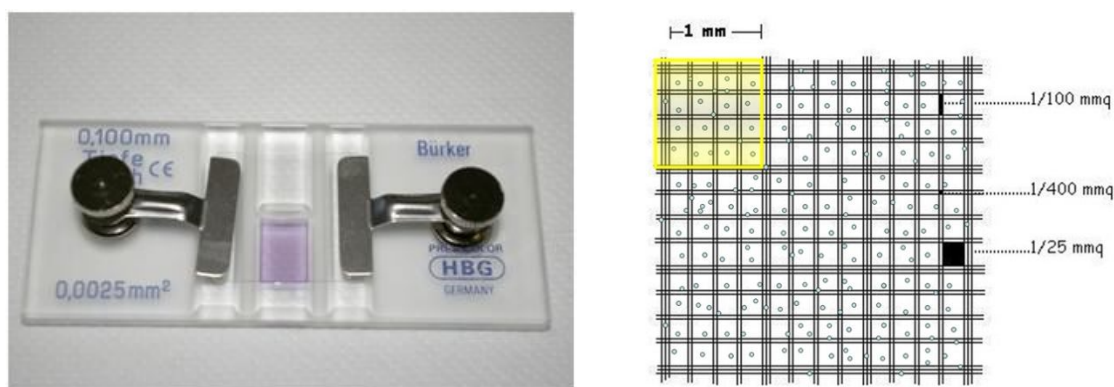
### Tail Abnormalities:



**Figura 6.** Possibili anomalie degli spermatozoi rilevabili alla valutazione morfologica divise per anomalie della testa, del collo e della coda.

In alcuni casi in cui il volume dell'eiaculato lo ha permesso, è stata eseguita anche la conta degli spermatozoi per stimarne il numero totale e la concentrazione. A questo fine il materiale seminale è stato diluito con il PBS (phosphate buffered saline) fino ad arrivare ad un volume prestabilito di 100  $\mu\text{l}$ , aggiungendone un volume pari alla differenza 100  $\mu\text{l}$  - volume stimato di seme. Cinque microlitri di seme così diluito sono stati aggiunti a 195  $\mu\text{l}$  d'acqua distillata (diluizione 1:40) che, inducendo la morte degli spermatozoi, ne ha permesso la conta. Si sono poi posizionati 5  $\mu\text{l}$  di questo campione all'interno della Camera di Burker. Nello spessore di 0,1 mm compreso fra il vetrino copri oggetto (trattenuto dalle apposite alette metalliche) e la camera contaglobuli si raccoglie un volume di 0,1  $\text{mm}^3$ . Il reticolo della camera di Bürker è fondamentalmente strutturato in nove quadrati più grandi (quadrato giallo) delimitati da tre righe parallele con all'interno quadrati e rettangoli delimitati da due righe parallele (fig.7). Una volta riempito per capillarità il sottile spazio fra coprioggetti e camera, si possono contare le cellule, riconoscendole come particelle più o meno rifrangenti a seconda del variare della

regolazione del fuoco del microscopio. Poiché la distribuzione cellulare può non essere perfettamente omogenea, è consigliabile contare gli spermatozoi in 4 quadrati grandi e calcolare la media: in questo modo si riduce il margine di errore. Il sistema per la conta degli spermatozoi all'interno del reticolo della Camera di Burker ha quindi previsto: il conteggio degli spermatozoi nei quattro quadranti grandi (meglio se quelli disposti a Y all'interno del reticolo), avendo cura di non considerare quelli all'interno delle 3 righe di confine su due soli lati e il calcolo della media dividendo il numero di spermatozoi contato per 4. A questo punto si è moltiplicato il numero ottenuto per il fattore di diluizione moltiplicato per 10 (10x40). La concentrazione di spermatozoi in 1 ml è risultata dunque dalla seguente formula:  $N \times 10 \times 40 \times 1000$  (dove N è il numero di spermatozoi contati). Moltiplicando il risultato  $\times 0,1$  si è ottenuto il numero totale di spermatozoi in 100 mcl (volume di partenza).



**Figura 7.** Camera di Burker utilizzata per la conta degli spermatozoi per ottenere la stima della concentrazione e numero totale di spermatozoi nell'eiaculato.

## E. SECONDO PRELIEVO DI SANGUE:

Il secondo prelievo di sangue ad un'ora dalla somministrazione del GnRH ci ha permesso di misurare il livello di testosterone post-stimolazione. La differenza tra la concentrazione sierica di testosterone post e pre-stimolo con l'agonista del GnRH (Fertagyl®, Intervet) è servita per verificare, mediante analisi statistica, l'uguaglianza d'effetto del farmaco per via endovenosa e intramuscolare. Questo test di stimolo è servito inoltre per misurare la concentrazione sierica di testosterone dopo il picco di LH indotto dalla somministrazione del GnRH, in quanto la secrezione giornaliera di questi ormoni segue un andamento ondulatorio e, non facendo questo test, potremmo ottenere una concentrazione più o meno alta a seconda della fase di secrezione della giornata.

## F. IMPIANTO DI DESLORELIN:

In seguito si è effettuato l'impianto da 9.4 mg di deslorelin (Suprelorin 12, Virbac). Per quanto riguarda la zona d'inoculo si è deciso di dividere gli animali in due gruppi: in sei gatti l'impianto è stato posto a livello di sottocute nella zona interscapolare, per gli altri sei invece è stato posto a livello periombelicale (Tab. 2). Normalmente l'impianto viene posizionato tra le scapole ma la localizzazione periombelicale è stata già testata su alcuni cani (Fontaine et al., 2011): questo sito d'impianto non ha presentato nessun effetto indesiderato oltre ad avere il vantaggio che l'impianto può essere, se necessario, rimosso facilmente.



**Figura 8.** Inserimento dell'impianto dell'agonista del GnRH deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) a livello interscapolare e a livello ombelicale in due soggetti inclusi nello studio.

NUMERO	NOME	LOCALIZZAZIONE IMPIANTO
1	SILVESTRO	Interscapolare
2	NERONE	Ombelicale
3	MICIO 1	Ombelicale
4	MICIO 2	Interscapolare
5	ALDO	Interscapolare
6	PEPE	Ombelicale
7	TOM	Interscapolare
8	ZEUS	Interscapolare
9	ATTILA	Ombelicale
10	PORTHOS	Ombelicale
11	PETRONIO	Ombelicale
12	GOLIA	Interscapolare

**Tab. 2** Localizzazione (interscapolare o ombelicale) di un impianto di deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) in 12 gatti maschi post-puberi.



**Figura 9.** Kit per l'inserimento dell'impianto di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12 Virbac).

Il protocollo d'impianto a livello interscapolare ha previsto la disinfezione della zona con Betadine® ed alcool, il sollevamento di una plica cutanea, la perforazione della cute con l'apposito ago e la spinta dello stantuffo della siringa. A livello periombelicale si è seguito lo stesso protocollo preceduto dalla rasatura di una piccola zona caudalmente all'ombelico. Una volta posto l'impianto a livello sottocutaneo ne è stato verificato il corretto posizionamento mediante palpazione. L'impianto è costituito da un cilindretto di 2,3 mm di spessore e 12,5 mm di lunghezza contenente Deslorelin acetato (9.4 mg) ed una matrice inerte costituita principalmente da un aggregato lipidico ed un surfactante biologico. Tale impianto è precaricato all'interno di un ago che viene fissato ad una siringa multiuso munita di stantuffo (Fig.9).

#### G. QUESTIONARIO:

E' stato proposto un questionario ai proprietari per documentare le abitudini e le caratteristiche comportamentali del gatto. Nel questionario è stata data particolare attenzione al comportamento alimentare, al comportamento riproduttivo, al comportamento eliminatorio e di marcatura, all'attività diurna e notturna, al comportamento esplorativo e gioco ed alla relazione con l'uomo e conspecifici. I questionari utilizzati vengono riportati nella sezione 6. Allegati.

## 2.3 CONTROLLI SUCCESSIVI

Il protocollo sperimentale ha previsto controlli successivi all'impianto a distanza di quindici giorni fino ai due mesi; poi le visite si sono susseguite ogni due mesi fino ai sei mesi. Successivamente i controlli sono stati dilazionati ogni 6 mesi. Ai controlli post-impianto il protocollo ha previsto:

- Esame clinico generale per verificare lo stato di salute del soggetto ad ogni incontro;
- Ispezione e palpazione del sito d'impianto ad ogni incontro per evidenziare possibili reazioni avverse, per verificarne la percezione e per escludere l'eventuale migrazione nel sottocute;
- Esame dell'apparato riproduttore ad ogni incontro per documentare il grado d'atrofizzazione testicolare, mediante misurazione dei testicoli con un calibro graduato, e la scomparsa delle spicole cornee. La valutazione del carattere spicole peniene è stata possibile mediante visualizzazione diretta del pene e classificazione in base a tre categorie (Fig. 12):

- spicole "presenti" se sulla superficie peniena erano presenti e ben visibili;
- spicole "regredite" se sulla superficie erano presenti ma ridotte di dimensioni;
- spicole "assenti" se la superficie della mucosa peniena era liscia.

Per ogni categoria è stato attribuito un punteggio (1 spicole presenti, 2 spicole regredite, 3 spicole assenti) che è stato sottoposto ad analisi statistica (ANOVA e indici di correlazione di Pearson).

- Test di stimolo con l'agonista del GnRH e prelievo di sangue dopo un'ora per il dosaggio del testosterone ad ogni incontro. Questo è servito per testare la capacità delle cellule gonadotrope di rispondere allo stimolo del GnRH tramite la secrezione di LH e FSH, che risulta poi nella secrezione di testosterone. Dopo aver verificato tramite analisi statistica l'uguaglianza d'effetto dell'agonista del GnRH sulla variazione della testosteronemia con le due modalità di somministrazione (endovenosa e intramuscolare) si è potuto procedere al test di stimolo somministrando il farmaco esclusivamente per via intramuscolare durante le visite di controllo successive. Questo ci ha permesso di evitare l'inserimento del catetere endovenoso, semplificando così la procedura e riducendo lo stress dell'animale.
- Prelievo di seme ai controlli previsti nei primi 2 mesi per evidenziare le eventuali modificazioni in motilità, morfologia, produzione spermatica e per valutare quindi in

quanto tempo i soggetti raggiungevano la sterilità.

- Questionario ai proprietari ad ogni incontro per evidenziare le loro impressioni riguardo al comportamento e alle abitudini dei propri gatti. Oltre al questionario proposto alla prima visita, ne è stato allegato un altro che riprendeva i vari parametri presi in considerazione nel primo questionario e ne voleva valutare l'eventuale modificazione rispetto a prima dell'impianto. Il proprietario ha dovuto infatti segnare su una tabella se quel dato carattere era "aumentato", "diminuito" o era rimasto "uguale".
- Prelievo di sangue per esame emocromocitometrico e biochimico completo ogni 6 mesi o quando ne è sembrato necessario.

## 2.4 ANALISI STATISTICHE

I dati raccolti sono stati analizzati utilizzando la procedura GLM del software SIGMASTAT 2. 03, attraverso ANOVA prendendo come variabili indipendenti la classe di distanza dall'impianto (CLASSE 0: giorno dell'impianto; CLASSE 1: periodo che include le visite effettuate a meno di 40 giorni dall'impianto incluso il quarantesimo giorno; CLASSE 2: visite incluse nel periodo che va dai 40 giorni ai 70 giorni dall'impianto compreso; CLASSE 3: periodo che va da 70 giorni a 180 giorni dall'impianto compreso; CLASSE 4: tutte le visite effettuate a più di 180 giorni dall'impianto) e la classe d'età (GIOVANI: include tutti i soggetti che alla visita pre-impianto risultavano avere un'età  $\leq$  a 9 mesi; ADULTI: include i soggetti che alla visita pre-impianto risultavano avere un'età  $>$  9 mesi). In tutti i casi la classe di distanza è stata la variabile indipendente fissa associando le altre variabili indipendenti in una procedura TWO-WAY ANOVA. Questa analisi è stata utilizzata anche per valutare la variazione della testosteronemia in relazione alla classe di distanza dall'impianto ed in base alla localizzazione del sito d'impianto, senza prendere in considerazione la classe d'età. Tutti i soggetti inclusi nello studio sono stati infatti suddivisi in 2 gruppi in base al sito d'impianto: interscapolare (6 gatti) e ombelicale (6 gatti).

Inoltre è stato applicato un test t-student per evidenziare la differenza tra i livelli testosteronemici dopo stimolazione con GnRH somministrato per via intramuscolare ed endovenosa. Infine sono stati calcolati gli indici di correlazione di Pearson tra i parametri studiati, prendendo in considerazione valori non inferiori a 0,04 con  $P < 0,05$ .

Per i parametri comportamentali sono state calcolate le frequenze evidenziate all'interno di ogni singola classe di distanza dall'impianto.

# 3. RISULTATI

## 3.1 VISITA CLINICA ED ESAMI DEL SANGUE

### ESAME OBIETTIVO GENERALE

In questa sezione verranno esposti i risultati ottenuti durante il corso dello studio. All'anamnesi i proprietari non hanno riferito particolari condizioni patologiche riguardanti la storia clinica dei soggetti, a parte per i soggetti N° 6 e 12. Nel caso del soggetto N° 6 l'animale da cucciolo aveva presentato un episodio di natura neurologica caratterizzato da attacchi epilettiformi che si era però risolto spontaneamente. Questo episodio è stato ricondotto al rilascio di tossine dovute alla terapia antiparassitaria per un'infestazione massiva intestinale. La storia clinica del soggetto N°12 non lo vedeva come un ottimo candidato al progetto di ricerca, in quanto lo stato di salute all'inizio dello studio non era ottimale. Nell'aprile 2012, infatti, il gatto in questione è stato investito da una macchina ed ha riportato una doppia frattura al bacino a livello della sinfisi pubica, una lussazione dell'anca destra, che è stata ridotta mediante un tirante, una frattura della sinfisi mandibolare, trattata con un cerchiaggio, ed una frattura della branca della mandibola. Durante l'intervento all'anca è stata trattata una condizione di disidratazione mediante fluidoterapia e si è evidenziato uno stato di moderata anemia trattata con una trasfusione di sangue. Successivamente all'intervento ha cominciato a presentare sintomi quali poliuria, polidipsia, stranguria e disuria poi ricondotti ad una cistite sostenuta da batteri multiresistenti che è stata trattata con amoxicillina e acido clavulanico (Synulox® gocce 1,2 ml/dì per 10 giorni). Dopo la cistocentesi ha effettuato un altro ciclo di antibiotici per la cistite prendendo Synulox® pastiglie, un quarto di pastiglia ogni 8 ore per 10 giorni. A causa del vomito è stata interrotta la terapia ma alla successiva cistocentesi il campione di urina è risultato sterile. Il soggetto è stato seguito nell'iter diagnostico e terapeutico ed è stato introdotto nello studio una volta ristabilite le condizioni ottimali di salute. A causa di queste complicazioni il protocollo per questo gatto è stato leggermente diverso, in quanto non sono stati effettuati prelievi di seme per evitare l'utilizzo di farmaci sedativi con i relativi rischi correlati. Nonostante la storia clinica particolare, questo soggetto non ha avuto risposte manifestamente diverse rispetto agli altri gatti inclusi nello studio. Alla prima visita Golia presentava una tonicità muscolare del treno posteriore scadente,



un'asimmetria della mandibola ed un leggero stato di disidratazione dovuti all'intervento ma per il resto il soggetto si presentava in un buono stato di salute. Ad eccezione di quest'ultimo caso, alla visita pre-impianto non sono state evidenziate particolari condizioni patologiche e gli animali erano in buone condizioni di salute. Nella tabella n°3 sono riportati i rilevamenti clinici relativi alla prima visita.

La costanza dei controlli è stata influenzata dalla disponibilità individuale dei proprietari. Infatti per alcuni soggetti non è stato possibile rispettare la cadenza regolare delle visite. Due soggetti (3 e 5), per esempio, non sono stati più portati ai controlli successivi dopo la seconda visita (40 giorni post-impianto), in quanto i proprietari hanno riferito che i gatti in questione non sono più tornati a casa.

Durante il corso dello studio ci sono stati degli episodi di malessere in alcuni soggetti, nessuno riconducibile all'effetto dell'impianto. Tali episodi non sembrano aver influenzato la risposta all'impianto in nessun caso.

- Al soggetto N° 1 al sesto mese post-trattamento è stato diagnosticato un ascesso a livello zigomatico che è poi stato trattato con Amoxicillina (Clamoxil® 40 mg) 2 compresse per via orale due volte al giorno per 8 giorni.

- Il soggetto N° 6 alla seconda visita ha presentato un ascesso a livello di arto anteriore destro e un'area alopecica sulla coscia destra. È stata consigliata terapia antibiotica con amoxicillina e acido clavulanico (Synulox® 250 mg, un quarto di compressa per via orale mattina e sera per 15 giorni).

- Il soggetto N° 11 a quattro mesi dall'impianto è scappato di casa ed è tornato circa tre giorni dopo presentando sul dorso segni di graffiature probabilmente dovuti a litigi con altri gatti. È stata suggerita una terapia antibiotica per tre giorni ed è poi stato effettuato test Fiv Felv che è risultato negativo. Inoltre lo stesso soggetto ha presentato alcuni episodi di rinite e scolo congiuntivale di breve durata.

- Il soggetto n° 10 ha presentato episodi di diarrea a circa 35 giorni dall'impianto, poi ricondotti ad infestazione da Giardia. È stato trattato con fenbendazolo (Panacur®) per tre giorni, con il quale gli episodi di diarrea si sono risolti.

- In due soggetti (8 e 9) vi sono stati episodi di vomito e abbattimento circa 4 mesi dopo l'impianto. Uno di questi soggetti (N° 9) è stato anche ricoverato per una moderata disidratazione ed è stata effettuata fluidoterapia e terapia antibiotica. Gli esami del sangue non hanno rilevato nessun parametro al di fuori del range di normalità e l'animale è stato dimesso dopo pochi giorni, riconducendo questi episodi ad un'infezione virale generica.

A parte questi episodi, gli animali sono sempre stati in buone condizione di salute verificate anche mediante esame emocromocitometrico e biochimico completo, nel caso ci fosse stato il sospetto di alcune patologie.

## ESAMI DEL SANGUE

Alla prima visita i risultati degli esami del sangue non hanno evidenziato particolari alterazioni (Tab. 4). I principali parametri che si sono discostati dalla normalità sono stati:

- Colesterolo che è risultato elevato in sette gatti e sotto i limiti del range normale in due soggetti.
- Glicemia che è risultata superiore a 134 ng/dl in 10 dei 12 soggetti. Tale rilevamento potrebbe essere imputato al fatto che in alcuni casi i proprietari non erano sicuri che il gatto fosse a digiuno o allo stress relativo ai prelievi.
- Creatinin-chinasi che è risultata elevata in 6 dei 12 soggetti. Molto probabilmente ciò è dovuto al prelievo stesso o alla somministrazione di GnRH in quanto è un indicatore di danno tissutale.

Solo in un soggetto (N° 11) sono stati rilevati dei valori alterati di urea e creatinina in due successivi prelievi eseguiti a circa 2 mesi dall'impianto. L'aumento di questi valori potrebbe essere un'indicazione di un'iniziale condizione di insufficienza renale. Per questo motivo a questo soggetto non sono stati più effettuati prelievi di seme che, prevedendo l'uso di medetomidina, avrebbero potuto ridurre, anche se per poco, la perfusione renale.

Il soggetto n° 12 ha presentato al prelievo della prima visita dei valori elevati di globuli bianchi ed un leggero stato di anemia riconducibili allo stato di salute non ottimale. Questi però si sono risolti al prelievo effettuato alla visita successiva.

<b>GATTO</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>SVILUPPO SCHELETRICO E COSTITUZIONE</b>	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Molto buono	Buono	Buono	Buono	Buono	scadente
<b>STATO DI NUTRIZIONE E TONICITA' MUSCOLARE</b>	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono	Buono
<b>STATO DEL SENSORIO</b>	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile	Vigile
<b>SEGNI E ATTEGGIAMENTI PARTICOLARI</b>	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Nessuno	Mandibola spostata lateralmente
<b>CUTE E SOTTOCUTE</b>	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute elastica	Cute leggermente anelastica
<b>MUCOSE APPARENTI</b>	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Rosee TRC<2 sec	Leggermente pallide TRC<2 sec
<b>LINFONODI ESPLORABILI</b>	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati	Non aumentati
<b>TEMPERATURA (C°)</b>	38,3	38,3	38	37,6	37,7	38,3	37,7	38	38,1	39,6	38,1	37,7
<b>POLSO (polso/min)</b>	108	200	100	150	168	120	182	140	133	120	90	100
<b>RESPIRO (respiri/min)</b>	80	48	56	35	40	45	45	50	39	45	45	40
<b>GRANDI FUNZIONI ORGANICHE</b>	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma	Nella norma

**Tab. 3** Esame obiettivo generale di 12 gatti maschi post-puberi alla visita prima dell'inserimento di un impianto di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). La prima riga riporta il numero del gatto a cui si fa riferimento: 1 Silvestro, 2 Nerone, 3 Micio1, 4 Micio2, 5 Aldo, 6 Pepe, 7 Tom, 8 Zeus, 9 Attila, 10 Porthos, 11 petronio, 12 Golia

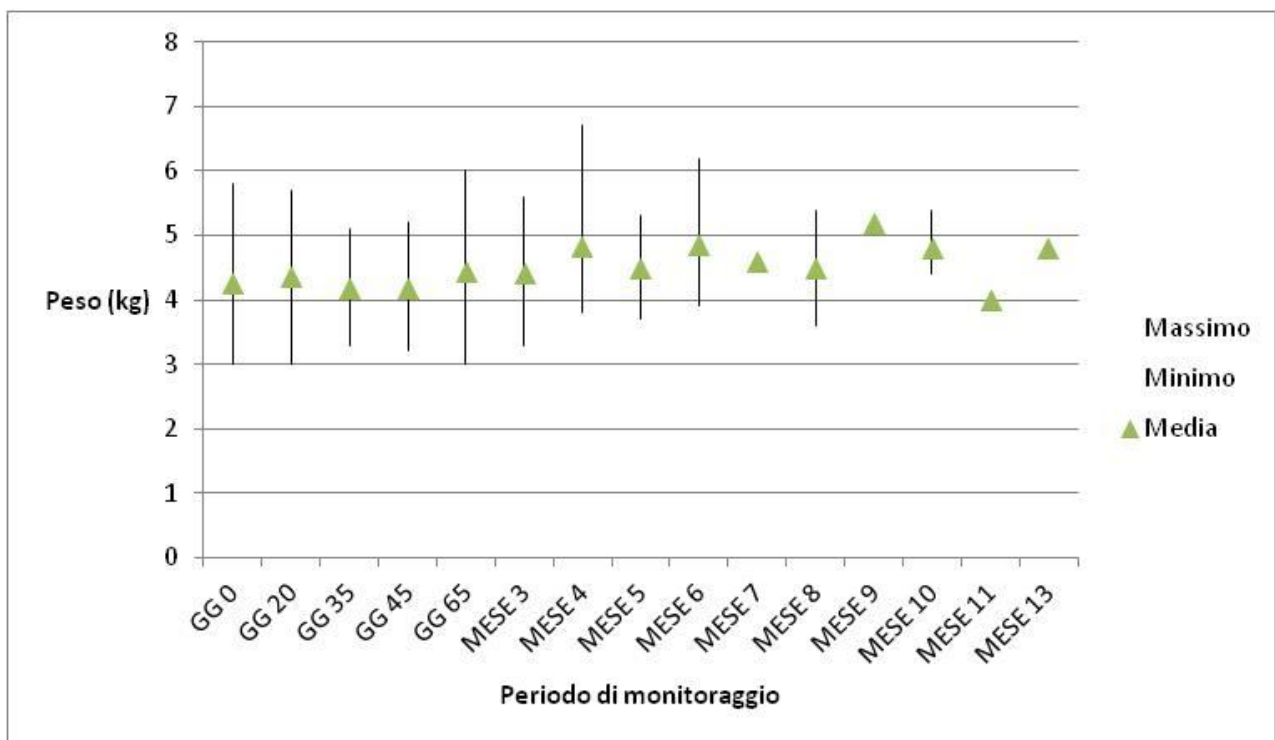
PROFILO EMATOLOGICO													
N° gatto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Valori di riferimento
Leucociti	19	14,9	11,7	11,6	12	12	14,9	16,3	10	16,2	10,6	30*	5-19x10 <sup>3</sup> /mcl
Eritrociti	8,9	7,8	7,3	6,3	8,7	7,5	7,9	8,53	10,8	8,4	8,9	5,5	5-10x10 <sup>6</sup> /mcl
Emoglobina	13,4	10,8	10	9,1	12,3	10	11	11	13,9	11,5	12,4	7,7*	10-15 g/dl
Hct	40,9	30	31	24,4*	37,9	32,4	34,2	32,6	43,8	31,5	37,8	26*	30-45 %
MCV	46,2	39	42,5	38,6*	43,2	43,3	43	39	40,3	37,5	42,3	46,6	39-55 fl
MCHC	32,6	36	32,1	37,1	32,3	31	32,3	33,7	31,8	36,5	32,9	30	30-36 g/dl
Piastrine	431	447	696	730	408	20*	481	300	510	259	207	308	156-800x10 <sup>3</sup> /mcl
Neutrofili	53	56	48	46	60	56	74	48	39	48	48,6	83*	35-75 %
Linfociti	31	34	43	46	26	26	20	44	54	40	44,6	14*	20-55 %
Monociti	5*	4	2	4	6	10	2	2	2	5	1,8	1,8	1-4 %
Eosinofili	9	0	7	2	8	8	0	2	4	7	4,6	1,2*	2-10%
Basofili	2*	0	0	2*	0	0	0	0	1	0	0,3	0,1	0-0,5 %
PROFILO BIOCHIMICO													
Bilirubina	0,06	0,11	0,24	0,24	0,25	0,26	0,07*	0,06*	0,08*	0,2	0,13	0,19	0,1-0,5 mg/dl
AST	21*	29	35	33	18*	26	39	18*	16*	32	46*	32	26-43 U/l
ALT	59	55	43,9	33,8	44,5	55,5	57,3	50,6	43,2	45	63	96,1	6-83 U/l
GGT	0,86*	1,4	1*	0,32*	1,42	0,45*	0,07*	0,3*	3	3,5	0,82*	0,6*	1,3-5,1 U/l
Creatinina	1,04	1,16	1,14	1,28	1,1	1,56	1,42	1	1,2	0,94	1,8	0,82	0,8-1,8 mg/dl
Azotemia	56	59	63	43	37	65	44	54	59	55	65	74*	20-65 mg/dl
Albumina	19	26	31,4	27,9	29,9	26,5	27,7	22,3	23	27	31	24,4	21-33 g/L
Prot. Tot.	58	72	66,2	68,3	66,5	74,6	67,5	58,1	56,8	60,8	64,3	54,6	54-78 g/L
Colesterolo	85*	126	158*	152*	164*	174*	147*	104	114	148*	193*	86*	95-130 mg/dl
Trigliceridi	35	52	62	96	45	84	31	47	49	68	24	165*	10-114 mg/dl
Glicemia	230*	329*	409*	417*	309*	141*	323*	379*	161*	288*	89	118	73-134 mg/dl
CK	325*	192	720*	599*	162	223	173	338*	117	224	560*	311*	18-230 U/l

**Tab. 4** Esame emocromocitometrico e biochimico in 12 gatti maschi interi post-puberi di età compresa tra 6 mesi e 5 anni. La prima riga riporta il numero del gatto a cui si fa riferimento: 1 Silvestro, 2 Nerone, 3 Micio1, 4 Micio2, 5 Aldo, 6 Pepe, 7 Tom, 8 Zeus, 9 Attila, 10 Porthos, 11 petronio, 12 Golia. Con l'asterisco vengono segnati i valori fuori range.

## PESO CORPOREO

La misurazione del peso è stata eseguita per tutti i soggetti ad ogni incontro. Le variazioni percentuali rispetto al peso iniziale sono riportate nella tabella N°5. Dall'osservazione dell'andamento di questo parametro durante il periodo di monitoraggio, si è notata la variazione sia in senso d'incremento che di decremento. In alcuni soggetti, infatti, si è rilevato un aumento del peso (1, 6, 8, 9, 10, 11 e 12), che in tutti i casi ha raggiunto alla classe di distanza 4 (>180 giorni dall'impianto) una percentuale d'incremento superiore al 4-5%, che viene considerata una variazione fisiologica, mentre in altri soggetti (2, 3, 4 e 5) tale parametro è rimasto costante o si è ridotto.

Dal grafico 1 si può notare che la media del peso dei gatti alle diverse date di rilevazione è rimasta più o meno costante durante tutto il periodo di monitoraggio. A supporto di questa evidenza le analisi statistiche non hanno rilevato alcuna differenza significativa tra le medie del peso alle classi di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto), nonostante il P tendesse al valore limite (P=0,073) (Tab.6). È risultata invece una differenza statisticamente significativa tra le classi d'età (giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età) all'interno di ogni classe di distanza (P<0,001) (Tab. 6). Questo vuol dire che i soggetti giovani (≤ 9 mesi d'età) sono risultati avere un peso significativamente inferiore rispetto agli adulti (>9 mesi) indipendentemente dalla distanza dall'impianto e che entrambe le categorie non hanno subito aumento di peso statisticamente significativo. A supporto di quest'evidenza dalla tabella 17 si possono valutare gli indici di correlazione di Pearson che, relativamente al peso, hanno evidenziato un indice positivo e significativo (P<0,05) in relazione alla classe d'età.



**Grafico 1.** Peso medio ± deviazione standard (Kg) di 12 gatti maschi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) durante il periodo di monitoraggio. In ascissa è riportato il parametro peso e in ordinata il periodo di monitoraggio. GG indica il giorno medio relativo all'intervallo di tempo in cui sono stati raccolti i dati e MESE indica il mese del periodo di monitoraggio.

	CLASSE 1	CLASSE 2	CLASSE 3	CLASSE 4
1.SILVESTRO			26,6%	60%
2.NERONE	-1,7%	-10,5%	-10,5%	-10,5%
3.MICIO1		-4,3%		
4.MICIO2		-6,4%	-8,5%	-8,5%
5.ALDO		-2,5%		
6.PEPE	-6,4%	-2,1%	8,5%	12,7%
7.TOM	3,6%		1,8%	-1,8%
8.ZEUS	5,7%	5,7%	4,3%	24,3%
9.ATTILA	2,8%	5,5%	11,8%	33,2%
10.PORTHOS	0%	0%	15,6%	18,7%
11.PETRONIO	2,5%	2,5%	15%	25%
12.GOLIA	15,1%	24,4%	55,8%	44,2%

**Tabella 5.** Variazione percentuale del peso relativo alla classe di distanza (1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto) del monitoraggio rispetto al peso iniziale (classe 0) in 12 gatti maschi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac).

	PESO (kg)	
	GIOVANI	ADULTI
0	3,81 ± 0,20 <sup>a</sup>	4,86 ± 0,24 <sup>b</sup>
1	3,55 ± 0,22 <sup>a</sup>	4,97 ± 0,22 <sup>b</sup>
2	3,87 ± 0,17 <sup>a</sup>	4,80 ± 0,22 <sup>b</sup>
3	3,88 ± 0,17 <sup>a</sup>	5,36 ± 0,17 <sup>b</sup>
4	4,21 ± 0,17 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,20 <sup>b</sup>

**Tab. 6** Valori relativi al peso (media + errore standard medio) in 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) in base alle classi di distanza dall'impianto e classi d'età. Classi di distanza dall'impianto: 0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto. Classi d'età: giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età. Simboli differenti (\*;<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano una differenza significativa (P<0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani; adulti). Lettere differenti (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) tra classi d'età (giovani/adulti) identificano una differenza statisticamente significativa all'interno di ogni singola classe di distanza dall'impianto.

#### SITO D'IMPIANTO:

Ad ogni visita è stata esaminata l'area dove è stato posto l'impianto mediante ispezione del mantello e della cute per rivelare eventuali rossori o lesioni di altro genere e mediante palpazione per valutare la percezione dell'impianto nel sottocute e l'eventuale migrazione dello stesso. In nessun gatto è stata mai evidenziata alcuna alterazione di qualsiasi natura al sito d'impianto sia che fosse localizzato a livello interscapolare che a livello ombelicale. Alla percezione dell'impianto nel sottocute, questa è stata quasi sempre possibile e non ha mai rilevato la sua migrazione. In alcuni casi però la palpazione ed il ritrovamento della struttura cilindrica dell'impianto di deslorelin non è stata immediata in quanto si perdeva la sensazione netta dei suoi margini e veniva percepita come inglobata dal tessuto circostante. Alla prima visita, infatti, si riusciva a percepire chiaramente l'impianto a livello sottocutaneo, mentre, ai controlli successivi, il tempo impiegato a ritrovare la stessa

struttura sembrava aumentare.



**Figura 10.** Esame del sito d’impianto di deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) a livello ombelicale e interscapolare mediante ispezione e palpazione. Nelle figure sono rappresentati due soggetti inclusi nello studio: Pepe durante l’esame del sito d’impianto a livello ombelicale e Micio2 mentre viene palpato l’impianto a livello interscapolare.

### 3.2 ESAME CLINICO DELL’APPARATO RIPRODUTTORE

#### MISURE TESTICOLARI

All’esame obiettivo particolare dell’apparato riproduttore della prima visita tutti i soggetti sono stati classificati come post-puberi, in quanto in tutti è stato possibile sfoderare il pene dal prepuzio ed individuare la presenza delle spicole cornee. Non sono state evidenziate anomalie relative a forma, dimensione e sede dei testicoli. Infatti tutti i soggetti presentavano entrambi i testicoli nella loro sede anatomica, di dimensioni, forma e simmetria nella norma. Nella tabella 7 vengono riportati i rilevamenti dell’esame clinico riproduttivo relativi alla prima visita. I valori presentano una certa variabilità tra gli individui e, dalle analisi statistiche dei parametri valutati al giorno zero dall’impianto, risulta un indice di correlazione di Pearson di 0,42-0,45 tra misure testicolari (spessore, lunghezza e volume) e peso anche se tale relazione non è supportata da una significatività statistica ( $P=0,26-0,3$ ). Durante le visite successive all’impianto sono state prese le misure relative a lunghezza e spessore testicolari mediante un calibro graduato (Fig.11). La stima del volume testicolare è stata ottenuta mediante una formula matematica relativa al volume di un ellissoide. Considerando  $l$  la lunghezza (asse maggiore del testicolo),  $w$  e  $h$  rispettivamente spessore ed altezza, che nel nostro caso sono stati posti equivalenti alla misura dell’asse minore del testicolo, la formula utilizzata è stata la seguente:  $l \times w \times h \times 0,5236$  (P.G. Gouletsou et al 2008). C’è da considerare che le misurazioni relative alle

dimensioni testicolari, e di conseguenza anche il calcolo del volume, possono aver subito una sovrastima a causa del fatto che, mediante misurazione con calibro graduato, si interpone la cute e il pelo della regione scrotale tra testicolo e calibro. Nella tabella 8 sono riportati tutti i valori relativi alle misure testicolari dei gatti presi in considerazione nella sperimentazione durante tutto il corso del monitoraggio.



**Figura 11.** Misurazione dei testicoli in un gatto oggetto dello studio mediante calibro graduato.

GATTO	SPICOLE CORNEE	LUNGHEZZA TESTICOLO DESTRO (cm)	SPESSORE TESTICOLO DESTRO (cm)	LUNGHEZZA TESTICOLO SINISTRO (cm)	SPESSORE TESTICOLO SINISTRO (cm)	VOLUME TESTICOLO DESTRO (cm <sup>3</sup> )	VOLUME TESTICOLO SINISTRO (cm <sup>3</sup> )
1	presenti	1,2	1	1,2	1	0,63	0,63
2	Presenti	1,3	1,2	1,3	1,2	0,98	0,98
3	Presenti	1,3	0,9	1,3	0,9	0,55	0,55
4	presenti	1,3	1	1,3	1	0,68	0,68
5	presenti	1,6	1,4	1,6	1,4	1,64	1,64
6	presenti	1,3	1,4	1,3	1,4	1,24	1,24
7	presenti	1,5	1,7	1,5	1,7	2	2
8	presenti	1,2	1,4	1,2	1,4	1,05	1,05
9	presenti	1	1,2	1	1,2	0,63	0,63
10	presenti	0,8	1	0,8	1	0,33	0,33
11	presenti	1	1,5	1	1,5	0,78	0,78
12	presenti	1,2	1,5	1,2	1,5	1,13	1,13

**Tab. 7** Nella tabella vengono riportati i dati relativi all'esame clinico riproduttivo di 12 gatti maschi interi post-puberi alla prima visita prima di effettuare un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). Nella prima colonna viene riportato il numero di riferimento del: 1 Silvestro, 2 Nerone, 3 Micio1, 4 Micio2, 5 Aldo, 6 Pepe, 7 Tom, 8 Zeus, 9 Attila, 10 Porthos, 11 Petronio, 12 Golia. A seguire vengono riportati l'evidenza del carattere spicole peniene (presenti se sono state rilevate sulla mucosa peniena), i valori relativi a lunghezza, spessore del testicolo destro (cm), lunghezza, spessore del testicolo sinistro (cm) ed il volume del testicolo destro e sinistro (cm<sup>3</sup>) stimato mediante la formula relativa al volume di un ellissoide ( $l \times w \times h \times 0,5236$  dove  $l$  e lunghezza,  $w$  e  $h$  lo spessore).



N°	NOME	GIORNI DALL'IMPIANTO	LUNGHEZZA TESTICOLO DESTRO (cm)	SPESSORE TESTICOLO DESTRO (cm)	LUNGHEZZA TESTICOLO SINISTRO (cm)	SPESSORE TESTICOLO SINISTRO (cm)	VOLUME TESTICOLARE MEDIO (cm <sup>3</sup> )
<b>1</b>	<b>SILVESTRO</b>	0	1,2	1,0	1,2	1,0	0,63
		72	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		143	0,6	0,5	0,6	0,5	0,08
		205	0,6	0,5	0,6	0,5	0,08
		401	0,6	0,5	0,6	0,5	0,08
<b>2</b>	<b>NERONE</b>	0	1,3	1,2	1,3	1,2	0,98
		9	1,3	1,2	1,3	1,2	0,98
		66	1,0	0,9	1,0	0,9	0,42
		114	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		166	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		215	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		292	0,9	0,7	0,9	0,7	0,23
<b>3</b>	<b>MICIO 1</b>	0	1,3	0,9	1,3	0,9	0,55
		40	1,3	0,9	1,3	0,9	0,55
<b>4</b>	<b>MICIO 2</b>	0	1,3	1,0	1,3	1,0	0,68
		40	1,1	1,0	1,1	1,0	0,57
		56	1,1	1,0	1,1	1,0	0,57
		71	1,0	0,9	1,0	0,9	0,42
		120	1,0	0,8	1,0	0,9	0,42
		181	0,9	0,7	0,9	0,7	0,23
		258	0,9	0,7	0,9	0,7	0,23
<b>5</b>	<b>ALDO</b>	0	1,6	1,4	1,6	1,4	1,64
		40	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62
<b>6</b>	<b>PEPE</b>	0	1,4	1,3	1,4	1,3	1,23
		15	1,4	1,3	1,4	1,3	1,23
		40	1,4	1,1	1,4	1,1	0,88
		85	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62
		111	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62
		179	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62
		257	1,0	0,9	1,0	0,9	0,42
<b>7</b>	<b>TOM</b>	0	1,7	1,5	1,7	1,5	2,00
		25	1,7	1,3	1,6	1,3	1,40
		70	1,5	1,0	1,5	1,0	0,78
		97	1,3	1,0	1,3	1,0	0,68
		165	1,3	1,0	1,3	1,0	0,68
		243	1,1	0,9	1,1	0,9	0,46
<b>8</b>	<b>ZEUS</b>	0	1,4	1,2	1,4	1,2	1,05
		20	1,5	1,3	1,5	1,3	1,32
		33	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62

		48	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33
		62	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33
		98	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		160	0,9	0,7	0,9	0,7	0,23
		244	0,8	0,7	0,8	0,7	0,20
		308	0,7	0,6	0,7	0,6	0,13
<b>9</b>	<b>ATTILA</b>	0	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62
		20	1,2	1,0	1,2	1,0	0,62
		33	1,0	0,9	1,0	0,9	0,42
		48	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		62	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		104	0,9	0,8	0,9	0,8	0,30
		160	0,8	0,7	0,8	0,7	0,20
		244	0,8	0,7	0,8	0,7	0,20
		307	0,8	0,7	0,8	0,7	0,20
<b>10</b>	<b>PORTHOS</b>	0	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33
		19	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33
		35	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33
		49	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33
		63	1,0	0,8	0,9	0,7	0,28
		99	1,0	0,8	0,9	0,7	0,28
		161	0,8	0,6	0,7	0,5	0,12
		238	0,7	0,6	0,6	0,5	0,10
		330	0,7	0,5	0,7	0,5	0,09
<b>11</b>	<b>PETRONIO</b>	0	1,5	1,0	1,5	1,0	0,78
		14	1,5	1,0	1,5	1,0	0,78
		41	1,3	1,0	1,3	1,0	0,68
		64	1,1	0,9	1,1	0,8	0,46
		124	0,9	0,7	0,9	0,6	0,23
		252	0,6	0,5	0,6	0,5	0,07
		322	0,7	0,6	0,7	0,6	0,13
<b>12</b>	<b>GOLIA</b>	0	1,5	1,2	1,5	1,2	1,13
		21	1,6	1,2	1,6	1,2	1,20
		35	1,4	0,9	1,4	0,9	0,59
		47	1,2	0,8	1,2	0,8	0,40
		64	1,1	0,8	1,1	0,8	0,36
		126	1,1	0,8	1,1	0,8	0,36
		195	1,0	0,8	1,0	0,8	0,33

**Tab. 8** Misure testicolari (lunghezza, spessore e volume) di entrambi i testicoli in dodici gatti maschi adulti trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) durante tutto l'arco del monitoraggio.

Nella tabella 9 sono riportate le medie e l'errore standard medio dei valori di lunghezza, spessore e volume testicolare di tutti i gatti in base alla classe di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 ma <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 ma < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto) ed in base alla classe d'età (giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età).

Il monitoraggio delle dimensioni testicolari è stato possibile in 10 dei 12 soggetti inclusi nello studio per un periodo di tempo di 6-13 mesi, in quanto a due gatti non è stato possibile effettuare visite di controllo dopo i 40 giorni dall'impianto. In tutti e 10 i soggetti le dimensioni testicolari hanno presentato una riduzione importante nel primo periodo post-impianto raggiungendo i valori minimi intorno ai 100 giorni (range 48-181 giorni) dopo il trattamento, per poi risultare più o meno stabili ai controlli successivi a questo periodo. C'è da notare il caso particolare del soggetto 11 (Petronio) che ha presentato una riduzione progressiva dei volumi testicolari fino a raggiungere una percentuale di riduzione del 90% del volume iniziale alla visita dei 252 giorni post-trattamento, per poi alla visita successiva (a 322 giorni dall'impianto) mostrare un lieve aumento del volume testicolare pari all'83% del volume iniziale. Inoltre in due soggetti (Zeus e Golia) si è notato un lieve aumento (circa il 25 e 6% del volume iniziale rispettivamente) delle dimensioni testicolari alla visita effettuata a 20 giorni dall'impianto, per poi risultare inferiori anche al volume iniziale già alla visita successiva eseguita a 33 e 35 giorni dall'impianto.

Tendenzialmente quindi in tutti i soggetti vi è stata una decrescita graduale delle dimensioni testicolari, raggiungendo una percentuale di riduzione del volume medio attorno all'80% del volume iniziale nella classe di distanza 4 (>180 giorni dall'impianto). La riduzione del 50% delle dimensioni testicolari è stata raggiunta in media alla classe di distanza 2 dall'impianto (≥40 ma <70 giorni dall'impianto).

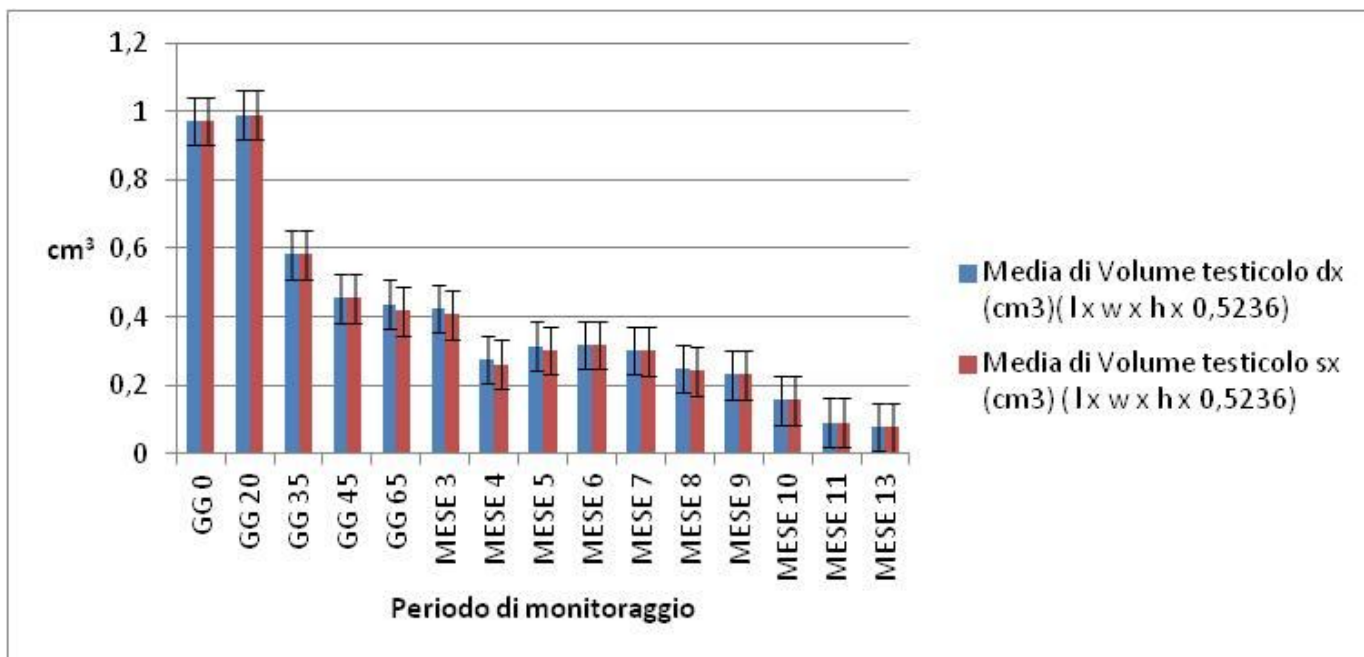
Come si può dedurre dalla tabella n°9, per quanto riguarda lunghezza, spessore e volume testicolare, vi è stata una differenza statisticamente significativa tra le classi di distanza e anche tra le classi d'età ( $P < 0,001$ ). Dai grafici 2 e 3 si può notare l'andamento delle dimensioni testicolari durante il periodo di monitoraggio, evidenziando la progressiva e costante riduzione di entrambi i volumi testicolari.

Riferendoci agli indici di correlazione di Pearson (tab.17) è risultata una correlazione positiva e significativa (indice di correlazione > 0,4 e  $P < 0,05$ ) tra i volumi testicolari e il livello di testosteronemia post-GnRH ed una correlazione negativa importante tra volumi testicolari e le classi di distanza dall'impianto. Ciò vuol dire che, al diminuire della testosteronemia post-stimolo e all'aumentare della classe di distanza dall'impianto, si sono

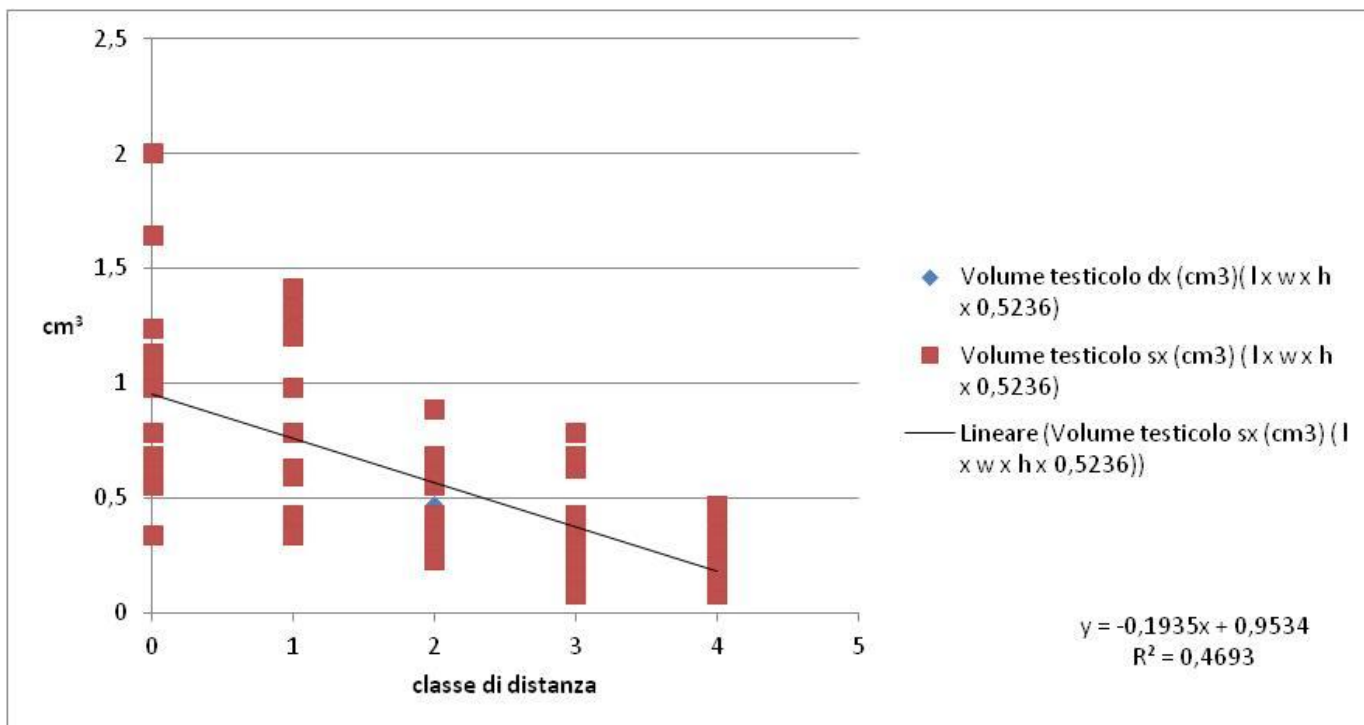
ridotti progressivamente i volumi testicolari e la relazione tra questi parametri è statisticamente significativa.

	LUNGHEZZA TESTICOLO DX (cm)		LUNGHEZZA TESTICOLO SX (cm)	
	GIOVANI	ADULTI	GIOVANI	ADULTI
<b>0</b>	1,29 ± 0,06 <sup>*a</sup>	1,48 ± 0,07 <sup>*b</sup>	1,29 ± 0,06 <sup>*a</sup>	1,48 ± 0,07 <sup>*b</sup>
<b>1</b>	1,15 ± 0,06 <sup>*∞a</sup>	1,48 ± 0,06 <sup>*b</sup>	1,15 ± 0,06 <sup>*∞a</sup>	1,47 ± 0,06 <sup>*b</sup>
<b>2</b>	1,05 ± 0,05 <sup>∞Ω</sup>	1,18 ± 0,06 <sup>∞</sup>	1,04 ± 0,05 <sup>∞Ω</sup>	1,18 ± 0,06 <sup>∞</sup>
<b>3</b>	0,88 ± 0,05 <sup>Ωβa</sup>	1,15 ± 0,05 <sup>∞b</sup>	0,86 ± 0,05 <sup>Ωβa</sup>	1,15 ± 0,05 <sup>∞b</sup>
<b>4</b>	0,75 ± 0,05 <sup>β</sup>	0,89 ± 0,06 <sup>Ω</sup>	0,74 ± 0,05 <sup>β</sup>	0,89 ± 0,06 <sup>Ω</sup>
	SPESSORE TESTICOLO DX (cm)		SPESSORE TESTICOLO SX (cm)	
	GIOVANI	ADULTI	GIOVANI	ADULTI
<b>0</b>	1,04 ± 0,05 <sup>*a</sup>	1,24 ± 0,06 <sup>*b</sup>	1,04 ± 0,06 <sup>*a</sup>	1,24 ± 0,07 <sup>*b</sup>
<b>1</b>	0,97 ± 0,06 <sup>*∞a</sup>	1,15 ± 0,06 <sup>*b</sup>	0,97 ± 0,06 <sup>*∞a</sup>	1,15 ± 0,06 <sup>*b</sup>
<b>2</b>	0,87 ± 0,04 <sup>*∞Ω</sup>	0,92 ± 0,06 <sup>∞</sup>	0,86 ± 0,05 <sup>*∞Ω</sup>	0,9 ± 0,06 <sup>∞</sup>
<b>3</b>	0,74 ± 0,04 <sup>Ωβa</sup>	0,91 ± 0,04 <sup>∞Ωb</sup>	0,73 ± 0,05 <sup>Ωβa</sup>	0,9 ± 0,05 <sup>∞Ωb</sup>
<b>4</b>	0,62 ± 0,04 <sup>β</sup>	0,74 ± 0,05 <sup>∞Ω</sup>	0,61 ± 0,05 <sup>β</sup>	0,74 ± 0,06 <sup>∞Ω</sup>
	VOLUME TESTICOLO DX (cm <sup>3</sup> )		VOLUME TESTICOLO SX (cm <sup>3</sup> )	
	GIOVANI	ADULTI	GIOVANI	ADULTI
<b>0</b>	0,79 ± 0,09 <sup>*a</sup>	1,23 ± 0,11 <sup>*b</sup>	0,79 ± 0,1 <sup>*a</sup>	1,23 ± 0,11 <sup>*b</sup>
<b>1</b>	0,61 ± 0,1 <sup>*∞a</sup>	1,04 ± 0,1 <sup>*b</sup>	0,61 ± 0,1 <sup>*∞a</sup>	1,04 ± 0,1 <sup>*b</sup>
<b>2</b>	0,43 ± 0,08 <sup>∞Ω</sup>	0,54 ± 0,1 <sup>∞</sup>	0,42 ± 0,08 <sup>∞Ω</sup>	0,52 ± 0,1 <sup>∞</sup>
<b>3</b>	0,28 ± 0,08 <sup>∞Ωβa</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>∞Ωb</sup>	0,26 ± 0,08 <sup>∞Ωβa</sup>	0,52 ± 0,08 <sup>∞Ωb</sup>
<b>4</b>	0,16 ± 0,08 <sup>Ωβ</sup>	0,28 ± 0,09 <sup>∞Ω</sup>	0,15 ± 0,08 <sup>Ωβ</sup>	0,28 ± 0,1 <sup>∞Ω</sup>

**Tab. 9** Valori (media + errore standard medio) dei parametri relativi a lunghezza testicolare destra e sinistra, spessore testicolare destro e sinistro, volume testicolare destro e sinistro in 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) in base alle classi di distanza (0, 1, 2, 3, 4) e classi d'età (giovane, vecchio). Le classi di distanza dall'impianto sono: 0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto. Le classi d'età sono: giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età. Simboli differenti (\*,<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano una differenza significativa (P<0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani;adulti). Simboli uguali (\*,<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano l'assenza di una differenza significativa (P>0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani; adulti). Lettere differenti (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) tra classi d'età (giovani/adulti) identificano una differenza statisticamente significativa all'interno di ogni singola classe di distanza dall'impianto.



**Grafico 2.** Istogramma dei valori medi relativi al volume testicolare destro e sinistro di 12 gatti maschi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) durante il periodo di monitoraggio. In ascissa c'è il periodo di monitoraggio dal giorno dell'impianto (con GG e MESE si intende il giorno medio e il mese relativo al range d'intervallo in cui sono stati presi i valori), in ordinata il volume (cm<sup>3</sup>) testicolare.



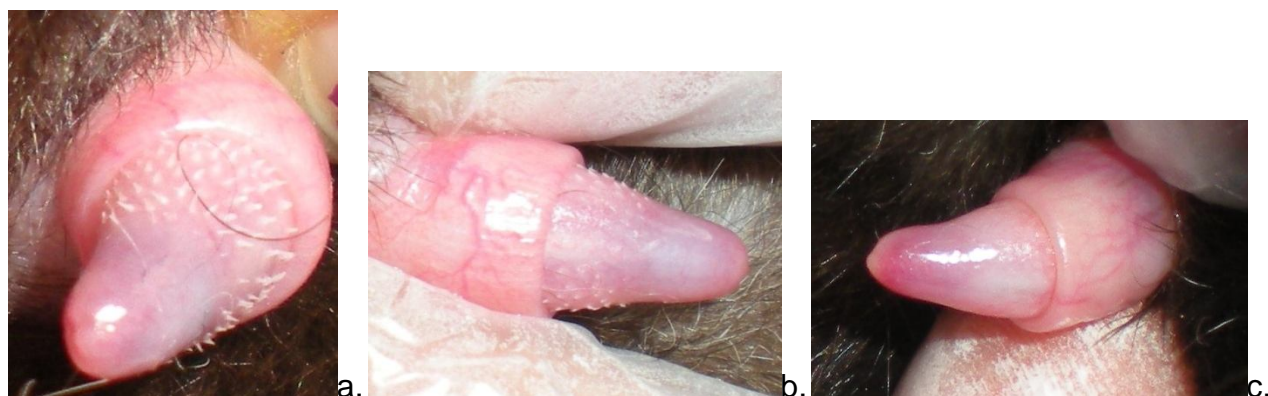
**Grafico 3.** Il grafico mostra la relazione tra volumi testicolari e classe di monitoraggio (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto) in 12 gatti maschi adulti trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). Vengono anche riportate le linee di tendenza lineari relative alla riduzione progressiva dei volumi testicolari.

## SPICOLE PENIENE:

La tabella 10 riporta le percentuali relative alla valutazione del parametro spicole in base alla classificazione di presenza, regressione o assenza di tale carattere all'interno delle varie classi di distanza dall'impianto. Nella quasi totalità dei casi questo carattere era regredito (spicole presenti ma di minor dimensione) già a 35 giorni dall'impianto ed è stato considerato assente in tutti i soggetti a sei mesi dall'impianto (grafico 4). Per il 50% dei gatti questo carattere era scomparso già a 65 giorni dall'impianto. Nei rimanenti soggetti tale caratteristica è scomparsa dai 3 mesi ai 6 mesi. I soggetti che hanno necessitato di un maggior intervallo di tempo per ottenere la perdita di tale carattere sono stati Tom e Silvestro in cui è stata documentata la scomparsa a 5 e 6 mesi post-impianto rispettivamente. Per tutta la durata del monitoraggio le spicole poi sono rimaste assenti in tutti i soggetti (Tab 12).

Per la valutazione statistica sono stati utilizzati i dati relativi alla classificazione seguente: 1 presenti, 2 regredite, 3 assenti. È risultata una differenza significativa tra le classi di distanza dall'impianto ( $P < 0,001$ ) e non si è evidenziata all'interno delle classi d'età (tab. 11). Si può dire quindi che c'è stata una reale variazione di questo parametro in relazione alla distanza dall'impianto sia nei gatti giovani ( $\leq 9$  mesi) sia nei gatti adulti ( $> 9$  mesi) e questa variazione è da interpretare come scomparsa del carattere.

Riferendoci agli indici di Pearson (tab. 17) esiste una correlazione positiva e significativa tra il carattere spicole e la classe di distanza, avendo posto un punteggio crescente allo scomparire del carattere. Esiste invece una correlazione negativa e statisticamente significativa con il livello di testosteronemia post-stimolo e con le dimensioni testicolari rispettivamente spessore, lunghezza e volume testicolare. Da questi risultati si evince che, all'aumentare della classe di distanza dall'impianto e al diminuire della testosteronemia (correlata alla diminuzione delle dimensioni testicolari), le spicole tendono a regredire.



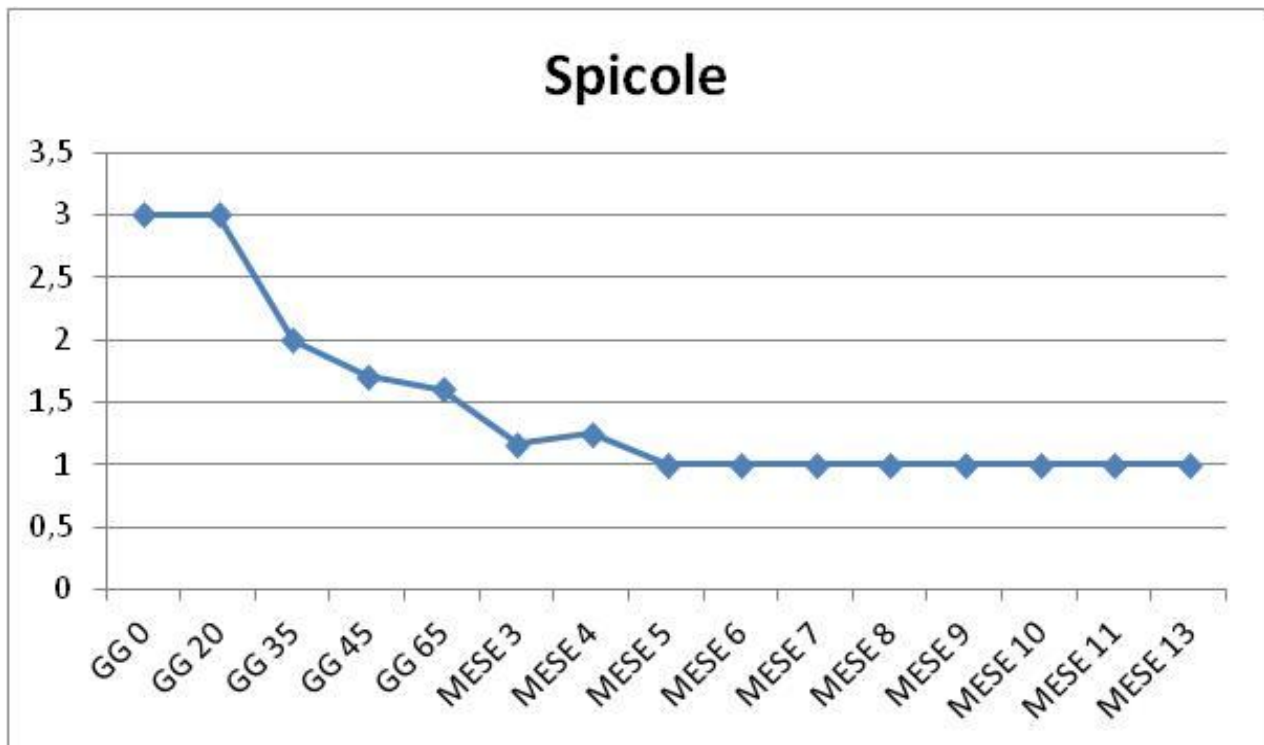
**Figura 12.** Mucosa peniena di un gatto oggetto dello studio rispettivamente a 0 (a.), 35 (b.) e 65 (c.) giorni dall'impianto di deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). Dall'evidenziazione del carattere spicole peniene è stato classificato questo parametro in 3 categorie: spicole "presenti" se sulla superficie peniena erano presenti e ben visibili (a.); spicole "regredite" se sulla superficie erano presenti ma ridotte di dimensioni (b.); spicole "assenti" se la superficie della mucosa peniena era liscia (c.).

CLASSE DI DISTANZA	SPICOLE PRESENTI	SPICOLE REGREDITE	SPICOLE ASSENTI
0	100%	0%	0%
1	50%	50%	0%
2	2,6%	42%	55,4%
3	1,8%	7,4%	90,8%
4	0%	0%	100%

**Tab.10** Frequenza dei rilevamenti effettuati su 12 gatti maschi post-puberi trattati con un impianto di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) durante il monitoraggio in base all'evidenziazione e classificazione del carattere spicole peniene (presenti, regredite, assenti) all'interno delle varie classi di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto).

	SPICOLE (1 presenti, 2 regredite, 3 assenti)	
	GIOVANI	ADULTI
0	1 ± 0,18*	1 ± 0,21*
1	1,5 ± 0,19*	1,17 ± 0,19*
2	2,6 ± 0,15 <sup>Ω∞ a</sup>	2 ± 0,19 <sup>Ω b</sup>
3	2,7 ± 0,15 <sup>Ω∞</sup>	2,7 ± 0,15 <sup>∞</sup>
4	3 ± 0,15 <sup>Ω</sup>	3 ± 0,18 <sup>∞</sup>

**Tab.11** Media ± errore standard medio dei valori relativi al carattere spicole in 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) in base alle classi di distanza (0, 1, 2, 3, 4) e classi d'età (giovani, adulti). Le classi di distanza dall'impianto sono: 0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto. Le classi d'età sono: giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età. Simboli differenti (\*;<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano una differenza significativa (P<0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani; adulti). Simboli uguali (\*;<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano l'assenza di una differenza significativa (P>0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani; adulti). Lettere differenti (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) tra classi d'età (giovani/adulti) identificano una differenza statisticamente significativa all'interno di ogni singola classe di distanza dall'impianto.



**Grafico 4.** Grafico a linee che indica i valori medi risultati dalla classificazione del carattere spicole in dodici gatti maschi adulti trattati con impianto di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). In ascissa è riportato il periodo di monitoraggio dall'impianto (con GG e MESE si intende il giorno medio e il mese relativo al range d'intervallo in cui sono stati presi i valori), in ordinata i valori della classificazione del carattere spicole (3 presenti, 2 regredite, 1 assenti).



	GG 0	GG 20-25	GG 33-40	GG 41-56	GG 62-72	MESE 3	MESE 4	MESE 5	MESE 6	MESE 7	MESE 8	MESE 9	MESE 10	MESE 11	MESE 13
<b>SILVESTRO</b>	P				P		R		A						A
<b>NERONE</b>	P	P			R	A		A	A			A			
<b>MICIO1</b>	P		R												
<b>MICIO2</b>	P		R	R	A		A		A		A				
<b>ALDO</b>	P		R												
<b>PEPE</b>	P	P	R		A	A			A		A				
<b>TOM</b>	P	P			P	R		A			A				
<b>ZEUS</b>	P	P	R	A	A	A		A			A		A		
<b>ATTILA</b>	P	P	R	A	A	A		A			A		A		
<b>PORTHOS</b>	P	P	R	A	A	A		A			A			A	
<b>PETRONIO</b>	P	P		P	R		A				A		A	A	
<b>GOLIA</b>	P	P	R	R			A		A						

**Tab.12** Rilevazioni del carattere spicole peniene in 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) durante il periodo di monitoraggio. L'evidenza di questo carattere all'esame riproduttivo ha permesso la classificazione in tre categorie: spicole presenti (P) se sulla superficie peniena erano presenti e ben visibili, spicole regredite (R) se sulla superficie erano presenti ma ridotte di dimensioni, spicole assenti (A) se la superficie della mucosa peniena era liscia. Nella prima riga è riportato il periodo del monitoraggio a cui ci si riferisce :giorno 0 (GG0), intervallo 20-25 giorni (GG20-25), intervallo 33-40 giorni (GG 33-40), intervallo 41-56 giorni (GG 41-56), intervallo 62-72 giorni (GG 62-72), mese 3, mese 4, mese 5, mese 6, mese 7, mese 8, mese 9, mese 10, mese 11, mese 13 dall'impianto.

### 3.3 CONCENTRAZIONE SIERICA DEL TESTOSTERONE

#### LIVELLI DI TESTOSTERONE BASALE E TEST DI STIMOLO CON GnRH:

Alla visita pre-impianto è stato effettuato un prelievo di sangue prima del test di stimolo con GnRH per valutare i livelli di testosteronemia basale. Questi valori sono serviti poi per la valutazione della risposta data dall'aumento delle concentrazioni sieriche di testosterone a seguito della somministrazione dell'analogo del GnRH per via intramuscolare ed endovenosa. Sono stati suddivisi i soggetti in 2 gruppi: in un gruppo il farmaco è stato somministrato per via endovenosa, nell'altro per via intramuscolare. Nella tabella 13 sono riportati i dati relativi ai due gruppi di soggetti.

Mediante analisi statistica sono stati valutati i dati relativi ai due gruppi presi in considerazione: questi sono risultati omogenei per quanto riguarda peso, misure testicolari e valori di testosterone pre e post-stimolo, non essendo risultata alcuna differenza significativa ( $P>0,05$ ) (tab.14). È stato poi valutato il delta T (differenza tra livello testosterone post e pre-stimolo con GnRH) dei due gruppi di soggetti per valutare la risposta della testosteronemia dopo stimolo con GnRH nelle due vie di somministrazione: come riportato nella tabella 14 non è risultata alcuna differenza significativa ( $P>0,05$ ). Da questo è stato possibile dedurre che le due vie di somministrazione sono equivalenti per quanto riguarda l'andamento della testosteronemia. Questo ci ha permesso di semplificare notevolmente il protocollo per le visite di controllo successive all'impianto in cui abbiamo evitato di porre il catetere endovenoso e la somministrazione dell'agonista del GnRH (Fertagyl®, Intervet) è stata eseguita esclusivamente per via intramuscolare.

via somm. GnRH	n° gatto	peso (kg)	volume testicolare dx (cm <sup>3</sup> )	volume testicolare sx (cm <sup>3</sup> )	testosterone pre gnrh (ng/ml)	testosterone post gnrh (ng/ml)	delta (ng/ml)
IM	2	5,8	0,98	0,98	1,20	12,73	11,53
IM	4	4,7	0,68	0,68	9,16	10,88	1,72
IM	6	4,7	1,23	1,23	5,68	14,00	8,32
IM	10	3,2	0,33	0,33	0,10	2,81	2,71
EV	3	4,6	0,55	0,55	3,37	9,66	6,29
EV	5	4,1	1,64	1,64	0,41	7,03	6,61
EV	7	5,5	2,00	2,00	2,29	16,00	13,71
EV	8	3,5	1,05	1,05	3,89	6,76	2,87

**Tab. 13** Nella tabella vengono riportati i dati relativi a otto gatti suddivisi in due gruppi classificati in base alla via di somministrazione del GnRH (intramuscolo IM o endovena EV). Nelle colonne troviamo la via di somministrazione del GnRH, numero identificativo del gatto, peso (Kg), volume del testicolo destro (cm<sup>3</sup>), volume del testicolo sinistro (cm<sup>3</sup>), livelli sierici di testosterone basale (ng/ml), livelli di testosterone dopo stimolo con GnRH (ng/ml) e il delta T (differenza tra testosteronemia post-stimolo e testosterone basale).

	<b>GRUPPO 1 (EV)</b>	<b>GRUPPO 2 (IM)</b>	<b>P VALUE</b>
<b>PESO (kg)</b>	4,6 ± 0,53	4,43 ± 0,42	P = 0,806
<b>VOLUME TESTICOLO DX (cm<sup>3</sup>)</b>	0,81 ± 0,2	1,31 ± 0,32	P = 0,227
<b>VOLUME TESTICOLO SX (cm<sup>3</sup>)</b>	0,81 ± 0,2	1,31 ± 0,32	P = 0,227
<b>TESTOSTERONE PRE (ng/ml)</b>	4,04 ± 2,09	2,49 ± 0,77	P = 0,514
<b>TESTOSTERONE POST (ng/ml)</b>	10,11 ± 2,52	9,86 ± 2,15	P = 0,944
<b>DELTA TESTOSTERONE (ng/ml)</b>	6,07 ± 2,33	7,37 ± 2,28	P = 0,703

**Tab.14** Media ± errore standard medio riguardanti peso (kg), volume testicolare destro (cm<sup>3</sup>), volume testicolare sinistro (cm<sup>3</sup>), livello di testosterone pre-stimolo con GnRH (ng/ml), livello di testosterone post-stimolo con GnRH (ng/ml), differenza del valore T post e T pre-GnRH (Delta T ng/ml), relativi alle valutazioni effettuate alla prima visita (giorno 0 dall'impianto) rispettivamente per il gruppo 1 (GnRH somministrato EV) e per il gruppo 2 (GnRH somministrato IM). I due gruppi comprendono 4 gatti maschi ciascuno a cui è stato somministrato GnRH per via intramuscolare (gruppo 1) o per via endovenosa (gruppo 2). Il valore di P<0,05 identifica una differenza statisticamente significativa: in questo caso nessuno dei valori è statisticamente diverso tra i due gruppi indicando che i due gruppi presi in esame erano omogenei per i parametri presi in considerazione.

#### LIVELLI DI TESTOSTERONE POST-STIMOLO CON GnRH:

Già alla prima visita di controllo, eseguita a 19-72 giorni dall'impianto, i livelli di testosterone sono risultati nettamente calati in quasi tutti i gatti con poche eccezioni. Infatti a questo controllo la testosteronemia post-stimolazione è risultata per la maggior parte dei gatti inferiore a 0,1 ng/ml (la soglia minima di sensibilità per i valori di testosterone del metodo d'analisi del macchinario Immulite® è 0,1 ng/ml), tranne in quattro gatti (soggetti 6, 8, 11 e 12), in cui comunque il valore era molto inferiore rispetto a quello rilevato alla visita pre-impianto.

Nella tabella sottostante (Tab. 15) vengono riportati tutti i valori della testosteronemia dei soggetti trattati nel corso del monitoraggio. Da questa tabella si può notare come alle visite effettuate dopo 72 giorni dall'impianto tutti i gatti hanno raggiunto un livello di testosterone post stimolazione inferiore a 0,1 ng/ml, con l'eccezione del soggetto N° 6. Solo in questo soggetto infatti il testosterone non ha mai raggiunto valori inferiori a 0,1 ng/ml, anche se si sono ridotti notevolmente alle visite di controllo rispetto ai livelli pre-impianto.

C'è da notare inoltre come in due soggetti (Zeus e Porthos) vi sia stato un leggero incremento delle concentrazioni di testosterone a 160-244 e 161-238 giorni post-impianto rispettivamente.

N°	NOME	DATA PRELIEVO	GIORNI DALL'IMPIANTO	TESTOSTERONE BASALE (ng/ml)	TESTOSTERONE POST GNRH (ng/ml)
1	SILVESTRO	14/11/11	0	<0,1	9,81
		25/01/12	72		<0,1
		05/04/12	143		<0,1
		06/06/12	205		<0,1
2	NERONE	13/12/11	0	1,2	12,73
		17/02/12	66	<0,1	<0,1
		05/04/12	114	<0,1	<0,1
		06/06/12	166	<0,1	<0,1
		25/07/12	215	<0,1	<0,1
		10/10/12	292	<0,1	<0,1
3	MICIO 1	25/01/12	0	3,37	9,66
		05/03/12	40	<0,1	<0,1
4	MICIO 2	25/01/12	0	9,16	10,88
		05/03/12	40	<0,1	<0,1
		21/03/12	56	<0,1	<0,1
		05/04/12	71	<0,1	<0,1
		24/05/12	120	<0,1	<0,1
		24/07/12	181	<0,1	<0,1
		09/10/12	258	<0,1	<0,1
5	ALDO	26/01/12	0	0,42	7,03
		06/03/12	40	<0,1	<0,1
6	PEPE	26/01/12	0	5,68	14
		06/03/12	40		0,51
		17/05/12	111		0,27
		24/07/12	179		0,23
		10/10/12	257		0,239
7	TOM	10/02/12	0	2,29	52,3
		06/03/12	25		<0,1
		20/04/12	70		<0,1
		17/05/12	97		<0,1
		24/07/12	165		<0,1
		10/10/12	243		<0,1
8	ZEUS	16/02/12	0	3,89	6,76
		07/03/12	20		0,12
		20/03/12	33		<0,1
		05/04/12	48		<0,1
		18/04/12	62		<0,1
		24/05/12	98		<0,1
		25/07/12	160		0,12
		17/10/12	244		0,48
9	ATTILA	16/02/12	0	<0,1	
		07/03/12	20	<0,1	<0,1
		20/03/12	33		<0,1
		05/04/12	48		<0,1
		18/04/12	62		<0,1
		30/05/12	104		<0,1
		25/07/12	160		<0,1
		17/10/12	244		<0,1
10	PORTHOS	15/02/12	0	<0,1	2,81
		05/03/12	19		<0,1
		21/03/12	35		<0,1
		04/04/12	49		<0,1
		18/04/12	63		<0,1
		24/05/12	99		<0,1
		25/07/12	161		0,14
		10/10/12	238		0,21
11	PETRONIO	22/03/12	14		0,54

		11/05/12	64		<0,1
		10/07/12	124		<0,1
		14/11/12	252		<0,1
		24/01/13	322		<0,1
<b>12</b>	<b>GOLIA</b>	16/05/12	0	2,94	37,24
		28/06/12	21		<0,1
		12/07/12	35		0,14
		24/07/12	47		<0,1
		10/08/12	64		<0,1

**Tab. 15** Valori della testosteronemia basale e post-stimolo con GnRH in 12 gatti post-puberi, trattati con impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac), durante tutto il periodo di monitoraggio.

Dal punto di vista statistico i valori di testosterone ottenuti dopo somministrazione di GnRH hanno rivelato una significatività importante ( $P < 0,001$ ), in termini di differenza, tra la classe di distanza dall'impianto 0 e le altre classi di distanza (Tab.16). Non è stata invece evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa all'interno delle altre classi di distanza: la media del valore di testosterone post-stimolazione con GnRH alla classe 0 (giorno dell'impianto) è stata di 13,9 ng/ml contro la media alle altre classi di distanza che è stata sempre inferiore a 0,2 ng/ml. Ciò sta ad indicare che, rispetto ai valori di testosteronemia post-stimolo prima dell'impianto (classe di distanza 0), le concentrazioni rilevate alle visite successive (classe di distanza 1, 2, 3, 4) si sono rivelate statisticamente differenti ma non vi è stata una variazione significativa tra le classi di distanza post-impianto.

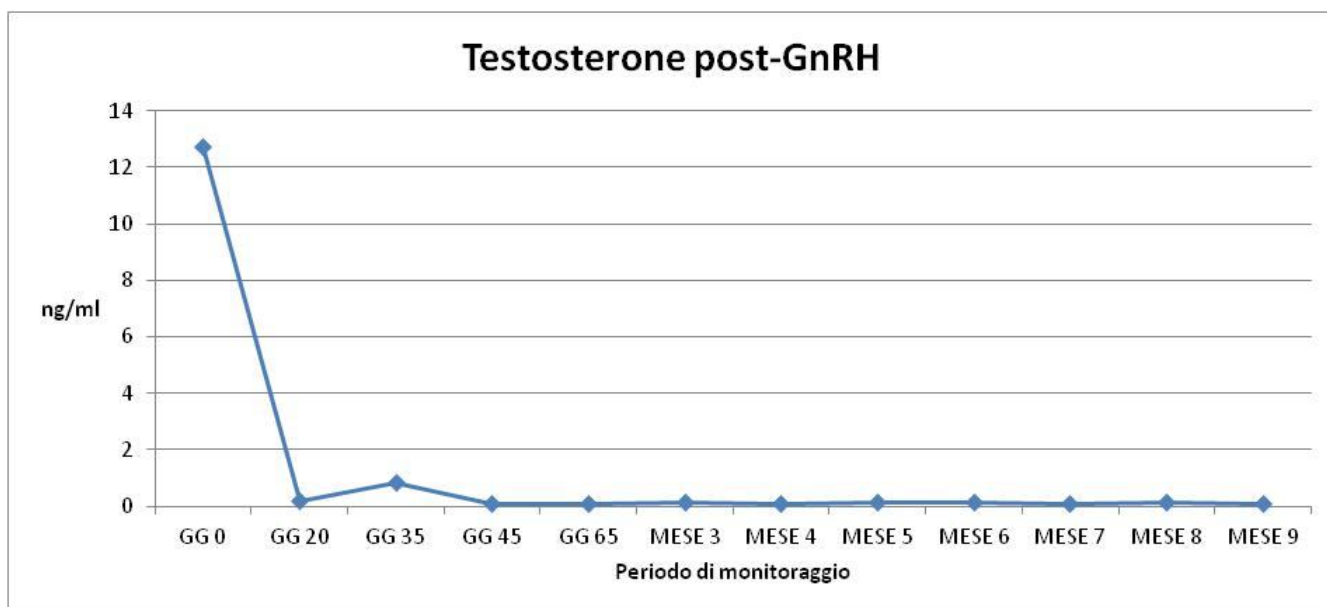
In riferimento alle classi d'età (giovani  $\leq 9$  mesi, adulti  $> 9$  mesi) è importante notare la differenza statistica che si è messa in luce all'interno della classe di distanza 0 per quanto riguarda la concentrazione di testosterone sierico post-stimolo (Tab.16). Anche il valore medio del delta T (differenza tra concentrazione di testosterone post-GnRH e testosterone pre-GnRH) alla visita prima dell'impianto è risultato differente tra i gatti giovani ( $\leq 9$  mesi) e quelli adulti ( $> 9$  mesi), avendo ottenuto un valore significativamente maggiore nella categoria adulti rispetto ai giovani ( $P = 0,041$ ).

Se facciamo riferimento agli indici di correlazione di Pearson (Tab 17) si possono evidenziare le relazioni intercorrenti tra i vari parametri presi in considerazione. Per quanto riguarda la concentrazione sierica di testosterone post-stimolo, esiste una correlazione negativa e significativa con la classe di distanza dall'impianto. Questo sta a significare che, all'aumentare della classe di distanza, vi è una diminuzione proporzionale della testosteronemia. Questo può essere osservato anche dai grafici sottostanti (grafico 5 e 6) che illustrano il suo andamento in base al periodo di monitoraggio e in base alla classe di distanza dall'impianto.

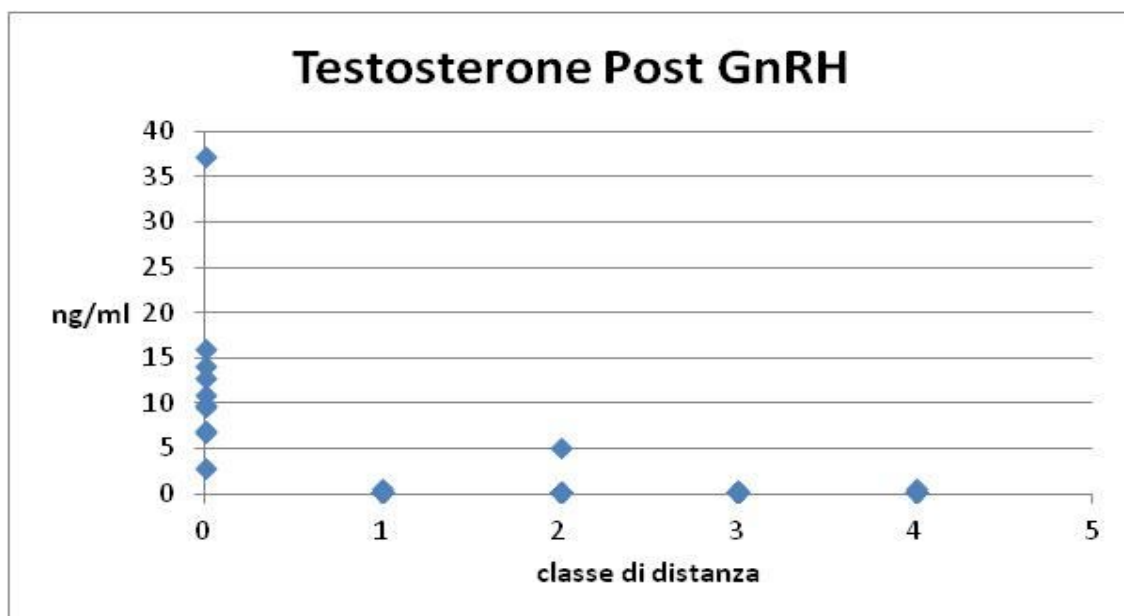
Sono stati valutati i valori di testosterone post-stimolo con GnRH anche in relazione alla localizzazione dell'impianto di deslorelin: ad un gruppo di 6 gatti era stato posto a livello interscapolare e negli altri 6 gatti era posto a livello ombelicale. L'analisi statistica di questi dati ha rivelato che non esiste una differenza significativa di questi valori in relazione alla localizzazione dell'impianto (P=0,413).

TESTOSTERONE POST (ng/ml)		
	GIOVANI	ADULTI
0	7,83 ± 1,21 <sup>*a</sup>	19,99 ± 1,48 <sup>*b</sup>
1	0,10 ± 1,21 <sup>Ω</sup>	0,22 ± 1,48 <sup>Ω</sup>
2	0,1 ± 0,94 <sup>Ω</sup>	1,11 ± 1,33 <sup>Ω</sup>
3	0,11 ± 0,94 <sup>Ω</sup>	0,14 ± 1,05 <sup>Ω</sup>
4	0,18 ± 1,21 <sup>Ω</sup>	0,14 ± 1,48 <sup>Ω</sup>

**Tab.16** Media + errore standard medio dei valori relativi a livelli di testosterone post stimolo con GnRH in 12 gatti maschi interi post-puberi, trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac), in base alle classi di distanza (0, 1, 2, 3, 4) e classi d'età (giovani, adulti). Classi di distanza dall'impianto: 0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto. Classi d'età: giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età. Simboli differenti (\*;<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano una differenza significativa (P<0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani; adulti). Simboli uguali (\*;<sup>Ω</sup> ecc.) tra classi di distanza identificano l'assenza di una differenza significativa (P>0,05) all'interno di ogni classe d'età (giovani; adulti). Lettere differenti (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) tra classi d'età (giovani/adulti) identificano una differenza statisticamente significativa all'interno di ogni singola classe di distanza dall'impianto.



**Grafico 5.** Tendenza del valore medio della testosteronemia post-stimolo con GnRH in 12 gatti maschi post-puberi, trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac), durante il periodo di monitoraggio. In ascissa c'è il periodo di monitoraggio (con GG e MESE si intende il giorno medio e il mese relativo al range d'intervallo in cui sono stati presi i valori), in ordinata i valori di testosteronemia (ng/ml).



**Grafico 6.** Il grafico mostra i valori delle concentrazioni di testosterone sierico post-stimolo con GnRH in base alle classi di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥70 e <180 giorni dall'impianto; 4 ≥180 giorni dall'impianto) in 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con un impianto di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). In ascissa sono indicati i giorni di distanza dal monitoraggio e in ordinata i livelli di testosterone (ng/ml).

	PESO	CLAS DIST.	T. POST	SPES. DX	LUNG.. DX	SPES. SX	LUNG. SX	V DX	V SX	SPICOLE
CLASSE D'ETÀ	0,74*	0,001	0,18	0,33*	0,40*	0,32*	0,41*	0,33	0,33	-0,105
PESO		0,20	0,09	0,19	0,24*	0,21	0,25*	0,21	0,22	0,07
CLAS. DIST.			-0,56*	-0,72*	-0,72*	-0,71*	-0,72*	-0,69*	-0,69*	0,82*
T. POST				0,51*	0,44*	0,50*	0,45*	0,53*	0,53*	-0,49*
SPES. DX					0,92*	0,99*	0,92*	0,96*	0,96*	-0,70*
LUNG. DX						0,91*	0,99*	0,91*	0,91*	-0,72
SPES. SX							0,92*	0,95*	0,96*	-0,70*
LUNG. SX								0,90*	0,99*	-0,73*
V DX									0,99*	-0,71*
V SX										-0,71*

**Tab. 17** Indici di correlazione di Pearson tra i vari parametri presi in considerazione durante il monitoraggio in dodici gatti maschi interi dopo l'impianto con deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). La presenza dell'asterisco (\*) indica una significatività statistica ( $P < 0,05$ ). Classe d'età: giovani ≤ 9 mesi d'età, adulti > 9 mesi d'età. Clas. Dist: classe di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥70 e <180 giorni dall'impianto; 4 ≥180 giorni dall'impianto). T. post: testosterone post stimolo con GnRH; Spes. Dx: spessore testicolo destro; Lung. Dx: lunghezza testicolo destro; Spes. Sx: spessore testicolo sinistro; Lung. Sx: lunghezza testicolo sinistro; V dx: volume testicolo destro; V sx: volume testicolo sinistro

### 3.4 PRELIEVO DI SEME:

Il protocollo ha previsto la raccolta di seme il giorno dell'impianto e alle visite di controllo successive fino al massimo al quarto mese dall'impianto (111 giorni). Il prelievo è stato eseguito in 11 di 12 gatti, in quanto per il soggetto 12 si è deciso di escludere questa procedura dal protocollo per evitare l'uso di farmaci sedativi a causa della storia clinica particolare di questo gatto. La frequenza dei prelievi ha dipeso molto dalla disponibilità dei proprietari a portarci i soggetti in visita durante questo periodo: in due soggetti (8 e 9) i prelievi sono stati effettuati ogni 15-20 giorni come da protocollo sperimentale (tot. 5 prelievi), mentre negli altri è stato possibile effettuare da 2 a 4 prelievi maggiormente dilazionati tra loro. Riassumendo quindi un eiaculato è stato prelevato in 8/11 gatti al giorno 0, in 8/11 gatti nell'intervallo 33-48 giorni dall'impianto, in 7/11 gatti nel periodo 62-72 giorni e in 2/11 gatti ai giorni 97 e 111 rispettivamente (Tab.19).

Il prelievo è stato eseguito mediante somministrazione di medetomidina e successiva cateterizzazione uretrale (Zambelli et al. 2008). Non sempre con questa procedura però si è ottenuta la raccolta del materiale seminale a causa di problemi tecnici. I principali problemi che si sono presentati sono stati: sedazione insufficiente del paziente che, all'introduzione del catetere urinario, reagiva con movimenti del treno posteriore; mancata introduzione del catetere urinario per difficoltà d'inserimento in uretra; mancato avanzamento del catetere in uretra; uscita di urina all'inserimento del catetere; prelievo di una quantità troppo limitata di materiale seminale.

Alcuni soggetti dopo somministrazione della medetomidina hanno presentato degli effetti collaterali quali vomito e scialorrea: questi episodi si sono rilevati circa nel 30% dei casi.

Nella tabella sottostante (Tab.18) vengono riportati i valori medi  $\pm$  l'errore standard medio relativo ai parametri presi in considerazione nella valutazione del materiale seminale e i risultati delle analisi statistiche effettuate su tali dati.



## PRODUZIONE SPERMATICA

Le rilevazioni riguardanti i parametri della valutazione dei campioni di seme sono riportate nella tabella 19. Viste le difficoltà tecniche e la numerosità non uniforme all'interno delle classi di distanza dall'impianto e all'interno delle classi d'età, questi dati sono solo osservazioni cliniche e non possono avere rilevanza statistica.

Dai prelievi effettuati su 9 soggetti alla prima visita (classe di distanza 0) si è evidenziato che, per 8 di questi, il materiale seminale conteneva spermatozoi (89%). Per quanto riguarda le altre classi di distanza (1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 ma <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 ma < 180 giorni dall'impianto), si può notare che la percentuale di prelievi che hanno evidenziato la presenza di spermatozoi è stata rispettivamente alla classe 1 circa il 70% (5/7), classe 2 il 64% (7/11) e classe 3 circa il 50% (3/5).

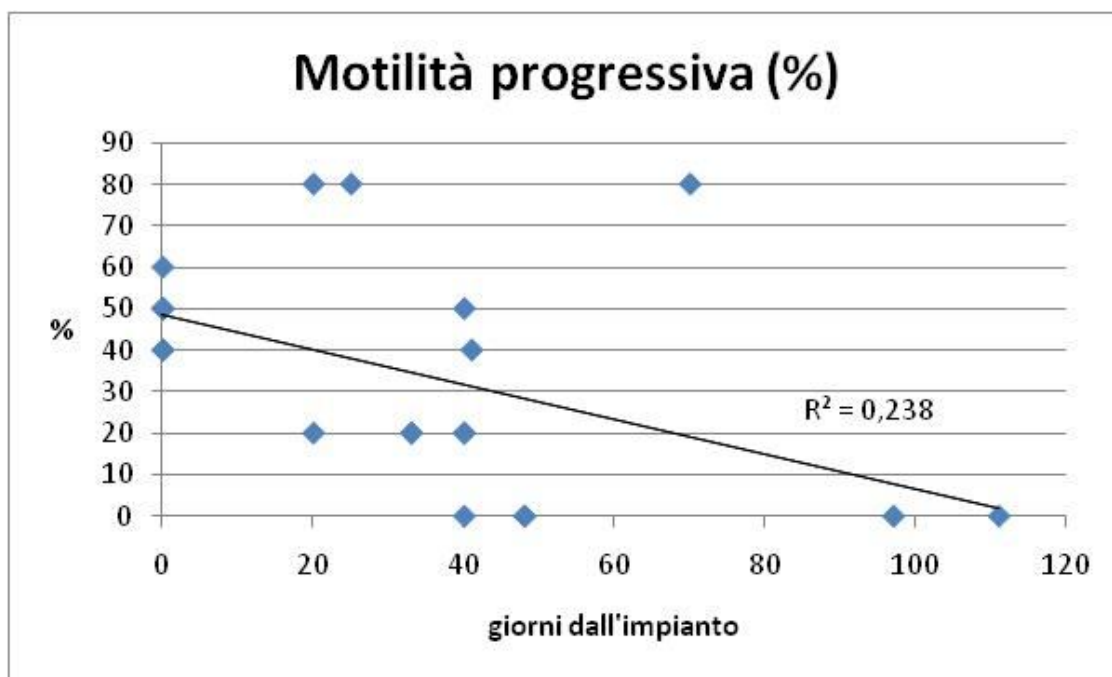
C'è da riferire che uno dei gatti presi in esame (soggetto n° 10) non ha mai presentato materiale seminale contenente spermatozoi. A questo gatto infatti sono stati effettuati tre prelievi di seme rispettivamente a 0, 20 e 35 giorni dall'impianto da cui però ne è derivato un campione seminale di aspetto trasparente privo di spermatozoi. Da quest'evidenze si è dedotto che il soggetto già prima dell'impianto non era in grado di produrre seme fertile in quanto probabilmente era ancora in una fase pre-pubere, nonostante l'evidenziazione delle spicole cornee alla prima visita. Questo gatto infatti, oltre ad essere molto giovane (8 mesi d'età), non aveva mai manifestato comportamenti tipici del maschio intero sessualmente maturo al momento dell'impianto e il valore di testosterone post-stimolo con GnRH alla visita pre-impianto è risultato di 2,81 ng/ml, un valore inferiore rispetto a quello degli altri soggetti inclusi nello studio. Per i gatti 3 e 5 non è stato possibile effettuare prelievi di seme successivi alla visita dei 40 giorni post-impianto in quanto non sono più stati portati alle visite di controllo successive. I prelievi di seme, che sono stati effettuati in questi due gatti, hanno evidenziato la presenza di spermatozoi motili anche alla visita post-impianto. Al soggetto numero 2 alla visita pre-impianto non è stata eseguita la raccolta del materiale seminale per problemi durante la procedura (difficoltà nell'inserimento del catetere in uretra). È stato poi effettuato un ulteriore prelievo di seme a distanza di 65 giorni dove non è stata rilevata la presenza di spermatozoi. Per questo soggetto però non possiamo imputare questa evidenza all'effetto del deslorelin in quanto non possiamo essere sicuri della fertilità del soggetto al momento dell'impianto.

Riassumendo quindi in cinque soggetti (1, 4, 8, 9, 11) si è evidenziata la presenza di spermatozoi in concomitanza del prelievo antecedente l'impianto e nei prelievi effettuati

alle prime visite post-impianto, per poi evidenziare la loro assenza all'ultimo prelievo effettuato a 62-72 giorni dall'impianto. Mentre solo in due soggetti (6 e 7) è stata rilevata la presenza di spermatozoi nel materiale seminale anche dopo i 2 mesi dall'impianto, rispettivamente a 97 e 111 giorni (Tab. 19). Si è deciso di non continuare ad effettuare prelievi di seme in questi due soggetti nonostante tali evidenze per evitare troppe sedazioni ripetute.

## VALUTAZIONE DELLA MOTILITA'

Da un punto di vista statistico non è stata rilevata alcuna differenza significativa per quanto riguarda la percentuale di spermatozoi progressivamente motili all'interno delle classi di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 ma <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 ma < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni), avendo ottenuto un P pari a 0,15. Come si può notare dalla tabella 18, relativamente a questo parametro, alla prima visita si ha una media di circa il 48% con un valore di deviazione standard relativamente basso (deviazione standard pari a 6,9). Già alla prima classe di distanza la media della motilità tende a calare ma il valore della deviazione standard aumenta notevolmente (media 44% con deviazione standard di 32,8). Questo indice si mantiene elevato anche nelle successive classi di distanza. Ciò sta ad indicare che al primo prelievo, relativo alla visita pre-impianto, la percentuale di motilità è risultata più o meno costante per tutti i soggetti mentre, nei prelievi effettuati ai controlli successivi, esiste un'alta variabilità dei valori. Questo deriva dal fatto che per alcuni soggetti (soggetti 3, 6, 7, 9 e 11) vi è stata una progressiva riduzione del parametro con il susseguirsi dei prelievi, mentre in altri (soggetti 4) è rimasto costante se non addirittura aumentato (soggetto 8) al primo prelievo post-impianto. Possiamo quindi affermare che in 5 di 7 soggetti, a cui sono stati eseguiti prelievi di seme seriali, si è evidenziata una progressiva riduzione della motilità e in 4 di questi, agli ultimi prelievi (eseguiti a 40, 48, 48 e 97 giorni rispettivamente), gli spermatozoi erano completamente fermi.



**Grafico 7.** Il grafico riporta i valori relativi alla percentuale di spermatozoi progressivamente motili valutata ai prelievi di seme effettuati durante il periodo di monitoraggio in 11 gatti maschi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). In ascissa ci sono i giorni di distanza dall'impianto, in ordinata la percentuale di motilità. Viene anche riportata la linea di tendenza dei dati e l' $R^2$  correlato.

CLASSI DISTANZA	MOTILITA' (%)	NORMALITA' (%)	ANOMALIE (%)	ANOMALIE TESTA (%)
0	48,6 ± 2,6 (N=7)	58,3 ± 4 (N=6)	41,7 ± 4 (N=6)	1 ± 0,26 (N=6)
1	44 ± 14,7 (N=5)	59,6 ± 7,3 (N=5)	40,4 ± 7,3 (N=5)	0,2 ± 0,2 (N=5)
2	18,6 ± 7,7 (N=7)	44,6 ± 6,3 (N=7)	55,4 ± 6,3 (N=7)	0,57 ± 0,3 (N=7)
3	26,7 ± 26,7 (N=3)	56,7 ± 17,9 (N=3)	43,3 ± 17,9 (N=3)	1,3 ± 0,67 (N=3)
CLASSI DISTANZA	ANOMALIE COLLO (%)	ANOMALIE CODA (%)	GOCCIA CITOPLOSMATICA (%)	TESTE STACCATE (%)
0	4,8 ± 0,48 (N=6)	7,7 ± 2,5 (N=6)	10,5 ± 3,3 <sup>*α</sup> (N=6)	17,7 ± 4,5 (N=6)
1	5 ± 0,32 (N=5)	18,8 ± 5,9 (N=5)	0,6 ± 0,4 <sup>**</sup> (N=5)	15,8 ± 3,6 (N=5)
2	6,1 ± 1,3 (N=7)	23,4 ± 4,4 (N=7)	0,57 ± 0,57 <sup>α</sup> (N=7)	24,6 ± 6,1 (N=7)
3	6 ± 1 (N=3)	12 ± 5 (N=3)	4,7 ± 0,3 (N=3)	19,3 ± 13,4 (N=3)
CLASSI DISTANZA	VOLUME EIAC. (cm)	STIMA VOLUME EIAC. (mcl)	CONCENTRAZIONE SPERMATOZOI (spr/ml)	NUMERO SPERMATOZOI (spr/eiac.)
0	1,98 ± 0,5 (N=8)	7,4 ± 2,1 (N=8)	27x10 <sup>7</sup> ± 67x10 <sup>7</sup> (N=2)	27x10 <sup>6</sup> ± 67x10 <sup>6</sup>
1	2,8 ± 0,9 (N=6)	10,7 ± 3,5 (N=6)	43x10 <sup>7</sup> ± 59x10 <sup>7</sup> (N=3)	43x10 <sup>6</sup> ± 59x10 <sup>6</sup>
2	1,2 ± 0,47 (N=11)	4,9 ± 1,7 (N=11)	37x10 <sup>7</sup> ± 33x10 <sup>7</sup> (N=2)	37x10 <sup>6</sup> ± 33x10 <sup>6</sup>
3	1,1 ± 0,37 (N=5)	5,2 ± 1,98 (N=5)		

**Tab.18** Media ± errore standard medio relativi ai parametri presi in considerazione nella valutazione del materiale seminale di 11 gatti maschi interi, trattati con un impianto di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac), in relazione alle classi di distanza dall'impianto: 0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto. Numero di simboli diversi (\*, α) stanno ad indicare la presenza di una differenza statisticamente significativa (P<0,001) all'interno delle classi di distanza. L'assenza di simboli sta ad indicare l'assenza di una differenza statisticamente significativa all'interno delle classi di distanza. A fianco della media e dell'errore standard medio viene riportato tra parentesi la numerosità dei dati relativi a ciascuna classe di distanza (N). Per quanto riguarda la concentrazione e il numero di spermatozoi nell'eiaculato non è stata effettuata nessuna analisi statistica in quanto la numerosità dei dati non lo ha permesso.

N°	gatto	gg dall'imp.	spermatoz.	motilita' (%)	normalita' (%)	anomalie (%)	anomalie testa (%)	anomalie collo (%)	anomalie coda (%)	goccia citopl. (%)	teste staccate (%)	stima volume eiac. (mcl)	concent. sperm. (spr/ml)
1	SILVESTRO	0	P	40%									
		72	A										
2	NERONE	65	A										
3	MICIO1	0	P	50%	55%	45%	1%	5%	5%	19%	15%		
		40	P	20%	51%	49%	1%	9%	10%	0%	29%	1	42X10 <sup>6</sup>
4	MICIO2	0	P	50%	45%	55%	1%	6%	5%	9%	34%	2	
		40	P	50%	33%	67%	0%	8%	37%	4%	18%	5	
		65	A										
5	ALDO	40	P	20%	42%	58%	0%	4%	37%	0%	17%	1	
6	PEPE	0	P	60%	74%	26%	0%	5%	8%	1%	12%	10	
		40	P	0%	74%	26%	1%	9%	8%	0%	7%	5	70X10 <sup>7</sup>
		111	P	0%	58%	42%	0%	7%	18%	4%	13%	2	
7	TOM	25	P	80%	71%	29%	0%	5%	15%	1%	8%	5	46X10 <sup>7</sup>
		70	P	80%	87%	13%	2%	4%	2%	5%	0%	10	
		97	P	0%	25%	75%	2%	7%	16%	5%	45%	10	
8	ZEUS	0	P	40%	64%	36%	1%	4%	11%	10%	10%	20	20X10 <sup>7</sup>
		20	P	80%	60%	40%	0%	4%	20%	0%	16%	20	52X10 <sup>7</sup>
		33	P	20%	76%	24%	0%	6%	10%	0%	8%	2	
		48	P	0%	30%	70%	0%	8%	22%	0%	40%	1	
		62	A									2	
9	ATTILA	0	P	50%	55%	45%	2%	6%	10%	21%	6%	10	34X10 <sup>7</sup>
		20	P	20%	57%	43%	1%	5%	8%	2%	27%	20	32X10 <sup>7</sup>
		33	P	20%	34%	66%	0%	5%	41%	0%	20%	2	
		48	P	0%	27%	73%	0%	0%	22%	0%	51%	1	
		62	A									2,5	
10	PORTHOS	0	A									2,5	
		19	A										
		35	A									15	
11	PETRONIO	0	P	50%	57%	43%	1%	3%	7%	3%	29%	5	
		41	P	40%	55%	45%	2%	5%	28%	0%	10%	5	
		64	A									10	

**Tab. 19** Parametri di qualità seminale ad ogni prelievo di seme effettuato su 11 gatti maschi interi prima e dopo trattamento con deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). Le prime colonne riportano il numero e il nome del gatto a cui si fa riferimento, poi in ordine troviamo i giorni di distanza dall'impianto in cui è stato effettuato il prelievo di seme, l'evidenziazione di spermatozoi nel materiale seminale (P indica presenza, A indica l'assenza di spermatozoi), la percentuale di spermatozoi progressivamente motili, la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali, la percentuale di spermatozoi con anomalie morfologiche, la percentuale di spermatozoi con anomalie della testa, del collo e della coda, la percentuale di spermatozoi con goccia citoplasmatica, la percentuale di teste staccate, la stima del volume dell'eiaculato (mcl) e la concentrazione spermatica dell'eiaculato (spermatozoi/ml).

	T POST	LUNGH. DX	SPESS. DX	SPICOLE	MOTILITA'	ANOMAL.	TESTE ANOM.	COLLO ANOM.	CODA ANOM.	GOCCIA CITOPL.	TESTE STACC.	STIMA VOLUME
CLASSE DISTAN.	-0,56*	-0,72*	-0,72*	0,82*	-0,43 $\mu$	0,20	0,06	0,26	0,32	-0,45*	0,15	-0,21
T POST		0,44*	0,51*	-0,49*	0,27	-0,26	0,12	-0,02	-0,47*	0,53*	-0,15	0,04
LUNGH. DX			0,92*	-0,72*	0,67*	-0,70*	0,26	-0,01	-0,5*	0,05	-0,49*	0,26
SPESS. DX				-0,7*	0,60*	-0,70*	-0,11	-0,06	-0,20	-0,07	-0,53*	0,41*
SPICOLE					-0,79*	-0,52*	-0,46	0,22	0,43 $\mu$	-0,39	0,47*	-0,41*
MOTILITA'						-0,50*	0,11	-0,27	-0,24	-0,26	-0,51*	0,38
ANOMAL.							-0,15	0,01	0,60*	-0,04	0,79*	-0,31
TESTE ANOM.								0,08	0,43 $\mu$	0,47*	-0,11	0,27
COLLO ANOM.									-0,03	-0,004	-0,12	-0,20
CODA ANOM.										-0,38	-0,14	-0,30
GOCCIA CITOPL.											0,20	0,20
TESTE STACC.												-0,22

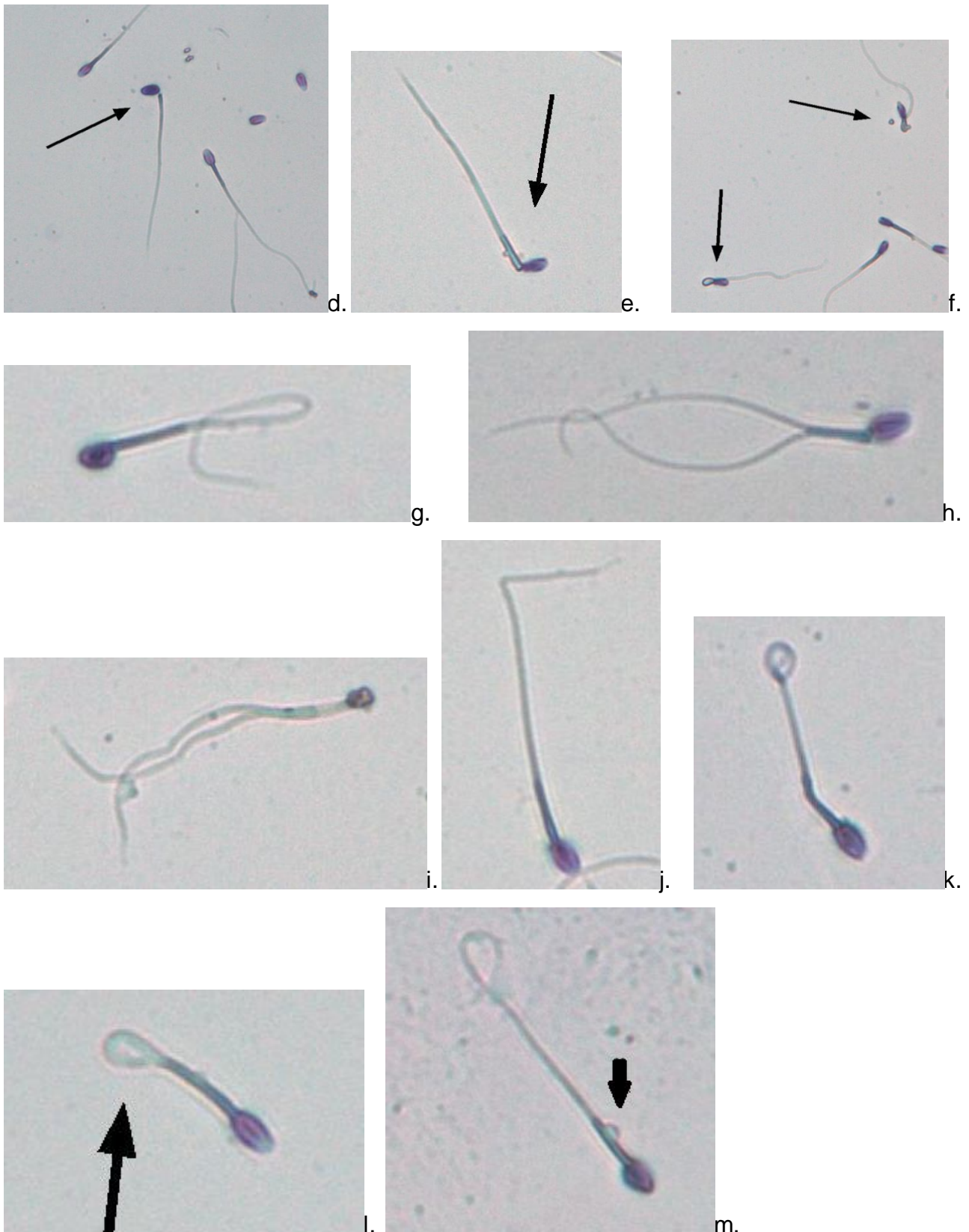
**Tab. 20** Indici di correlazione di Pearson tra i vari parametri presi in considerazione durante il monitoraggio in dodici gatti maschi interi dopo impianto con deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). La presenza dell'asterisco (\*) indica una significatività statistica ( $P < 0,05$ ). La presenza del simbolo  $\mu$  indica un P che tende a essere significativo ( $P = 0,0501$ ). Classe dist.: classe di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 < 40 giorni dall'impianto; 2  $\geq 40$  ma < 70 giorni dall'impianto; 3  $\geq 70$  ma < 180 giorni dall'impianto; 4  $\geq 180$  giorni dall'impianto). T post: testosterone post stimolo con GnRH; Lungh. Dx: lunghezza testicolo destro; Spess. Dx: spessore testicolo destro; Pres. Spermatozoi: presenza o assenza spermatozoi nell'eiaculato; Motilità: percentuale di spermatozoi progressivamente motili; Anomalie: percentuale di spermatozoi con anomalie morfologiche; Teste anom.: anomalie della testa; Collo anom.: anomalie del collo; Coda anom.: anomalie della coda; Goccia citopl.: goccia citoplasmatica; Teste stacc.: teste staccate.

## VALUTAZIONE MORFOLOGICA

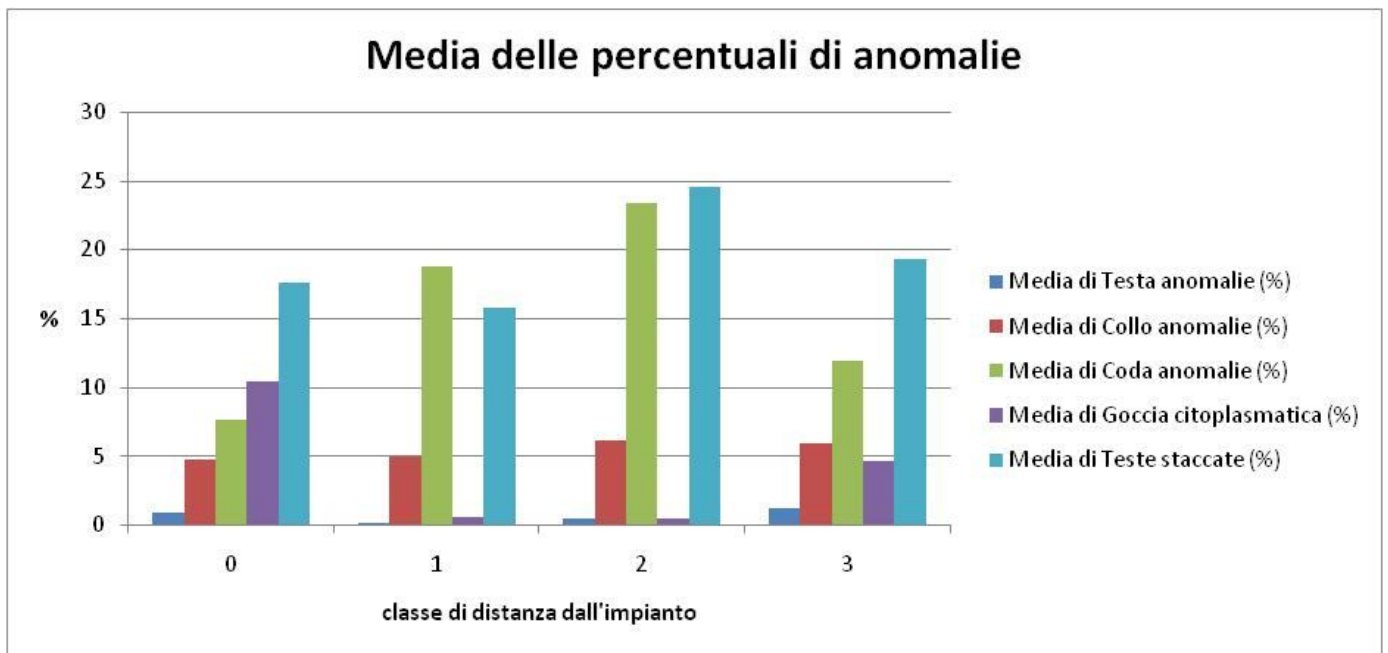
I dati ottenuti riguardanti la valutazione morfologica degli spermatozoi durante il corso del monitoraggio sono stati numericamente scarsi ed è per questo motivo che bisogna prendere in considerazione tali risultati con la relativa importanza.

La percentuale di spermatozoi morfologicamente anormali è stata più o meno costante all'interno delle varie classi di distanza dall'impianto con una media che variava da 40% a 55%. Infatti l'analisi statistica non ha rilevato alcuna differenza significativa tra questi valori ottenendo un P pari a 0,415. La tab.18 illustra i valori (media  $\pm$  errore standard medio) relativi alle varie classi di anomalie prese in considerazione: anomalie della testa, anomalie del collo, anomalie della coda, goccia citoplasmatica e teste staccate. Riferendoci ai risultati delle analisi statistiche, non si è evidenziata alcuna differenza significativa all'interno delle classi di distanza dall'impianto per quanto concerne anomalie della testa, collo, coda e teste staccate. È stata invece riscontrata un'evidenza, in termini di differenza, per il parametro goccia citoplasmatica, la cui media è risultata differente specificatamente tra le classi di distanza 0, 1 e 0, 2. Questi valori infatti tendono a ridursi con il progredire delle classi di distanza, per poi tornare a risalire in classe 3. Sempre parlando della percentuale di spermatozoi con goccia citoplasmatica è da notare l'esistenza di un indice di correlazione di Pearson negativo con un  $P < 0,05$  in relazione alla classe di distanza dall'impianto. Nel grafico 8 sono riportati gli andamenti dei valori medi delle percentuali relative a spermatozoi con anomalie della testa, collo e coda, goccia citoplasmatica, e teste staccate.





**Figure 13.** Spermatozoi con anomalie morfologiche identificati all'interno degli strisci di materiale seminale ottenuti mediante prelievi di seme effettuati su 11 gatti maschi interi prima e dopo impianto di deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac). **a.** Microcefalo; **b.** Teste doppie; **c.** Testa piriforme; **d.** Macrocefalo; **e.** Collo spezzato; **f.** Collo piegato; **g.** Collo abassiale; **h.** Coda doppia; **i.** Coda doppia + microcefalo; **j.** Coda spezzata; **k.** Coda arrotolata; **l.** Coda piegata; **m.** Goccia citoplasmatica



**Grafico 8.** Il grafico a istogramma riporta i valori medi delle percentuali relative alle anomalie rilevate alla valutazione morfologica di prelievi di seme effettuati su 11 gatti maschi, trattati con impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac), in relazione alle classi di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2  $\geq$ 40 e <70 giorni dall'impianto; 3  $\geq$  70 e < 180 giorni dall'impianto).

#### CONTA SPERMATICA:

I dati ottenuti riguardo la concentrazione ed il numero di spermatozoi nell'eiaculato sono stati numericamente scarsi in quanto la procedura di conta spermatica richiede un volume minimo di materiale seminale necessario alla stima. In molti casi tale volume è stato talmente esiguo che è bastato solamente per la valutazione di motilità e morfologia. Per quanto riguarda questi dati quindi non è stato possibile ottenere alcuna informazione statistica.



### 3.5 RISULTATI DEI QUESTIONARI

I dati relativi ai questionari proposti ai proprietari degli animali sono stati valutati mediante un'analisi della frequenza delle varie risposte in base alla classe di distanza dall'impianto (0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 ma <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 ma < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto). Per questi risultati quindi è stata fatta solamente una valutazione descrittiva e non statistica. Le percentuali delle risposte alle domande più significative vengono riportate nella tab.21 e 22. Le caratteristiche comportamentali che sono rimaste più o meno costanti nel corso dello studio sono state:

- gioco
- comportamento sociale con conspecifici
- aggressività verso conspecifici
- aggressività verso l'uomo
- attività giornaliera
- frequenza minzione
- frequenza defecazione
- attività notturna
- Graffiature
- Marcature facciali
- Controllo del morso e degli artigli
- Ore di accesso fuori casa
- Caccia
- Masturbazione (quasi mai riscontrata né prima né dopo l'impianto)
- Monta di oggetti (la risposta è stata quasi sempre "no" sia prima che dopo l'impianto)

I parametri che hanno subito delle variazioni considerevoli durante il periodo di monitoraggio invece sono stati:

- Sedentarietà che è aumentata in circa il 50% dei soggetti anche se dal questionario n° 1 la risposta che ha prevalso in tutte le categorie è stata "sedentarietà media".
- Appetito (i proprietari hanno riferito di un aumento nel 30% dei casi anche se al questionario la risposta è stata "buono" circa nel 100% dei casi a tutte le classi di distanza).

- Ore di sonno durante la giornata (aumentano nel 58% dei casi già alla classe di distanza 1 dall'impianto).
- Stato nutrizionale (aumenta progressivamente con l'aumentare della classe di distanza).
- Vocalizzazioni tendono a calare in circa il 30% dei casi.
- Tolleranza alle manipolazioni tende ad aumentare in circa 1/3 dei casi.
- La ricerca delle femmine cala progressivamente (risposta "sì" passa da un 45,5% prima dell'impianto a 0% a 70 giorni post-trattamento).
- La tendenza al vagabondaggio tende a ridursi in circa il 40% dei casi, negli altri soggetti rimane invariato.
- La difesa del territorio tende a ridursi.
- Gli accoppiamenti tendono a ridursi ma non del tutto, in quanto la risposta positiva a questa domanda è variata dal 36,3% al 18,2%.
- Marcatura del territorio tende a calare in circa il 40% dei casi .
- Modalità di minzione a spruzzo che tende subito a calare ( 45,4% di risposta "sì" alla classe zero contro una media di circa il 10% della stessa risposta alle classi successive).
- L'odore delle urine cala già alla prima classe di distanza dall'impianto in circa il 60% dei casi (prima dell'impianto il 72% dei proprietari rilevava un odore pungente delle urine, mentre alle altre classi di distanza la percentuale cala allo 0-25%).
- Affettuosità aumentata in più della metà dei soggetti.

Per alcuni parametri c'è da evidenziare una variazione relativa alla prima classe di distanza dall'impianto (<40 giorni dall'impianto), in cui si può osservare che nel 16% dei casi si ha avuto un aumento delle vocalizzazioni, della frequenza di minzione e una riduzione dell'appetito, mentre in un 8% dei casi si ha avuto l'aumento dell'aggressività verso conspecifici, dell'odore pungente delle urine, dell'interesse per le femmine e della marcatura del territorio. Un aumento simile di questi aspetti può essere notato dalla tabella 22 alla classe 4 in un 11% dei casi. In alcuni soggetti (per es. N° 6, 7 e 11) non vi è stata una perdita totale dei comportamenti tipici dei gatti maschi adulti quali la marcatura del territorio e il tentativo di monta delle femmine in calore. La proprietaria del soggetto 11, per esempio, ha riferito a circa 2 mesi dall'impianto di alcuni tentativi di monta di una gatta con cui convive appena entrata nel periodo del calore. La gatta in questione comunque è tornata in calore giusto un mese dopo il primo, per cui non è chiaro se abbia ovulato o no. Anche per quanto riguarda i soggetti 6 e 7, il proprietario ha riferito di accoppiamenti

avvenuti dopo l'impianto di deslorelin ma questi non hanno mai portato all'instaurarsi di una gravidanza.

	MONTA OGGETTI			MASTURBAZIONE			ACCOPIAMENTI		
	Si	NO	NON SO	Si	NO	NON SO	Si	NO	NON SO
0	0%	91%	9%	0%	91%	9%	36,3%	18,2%	45,5%
1	0%	92%	8%	0%	100%	0%	33,4%	16,6%	50%
2	0%	100%	0%	0%	100%	0%	18,8%	25%	56,2%
3	0%	100%	0%	5,8%	94,2%	0%	11,8%	29,4%	58,8%
4	0%	91%	9%	9%	91%	0%	18,2%	36,4%	45,4%

	VOCALIZZAZIONI			MINZIONE A SPRUZZO			APPETITO		
	Si	NO	NON SO	Si	NO	NON SO	SCARSO	BUONO	ECESSIVO
0	81,8%	9,1%	9,1%	45,4%	45,4%	9,2%	0%	91%	9%
1	75%	25%	0%	25%	66,7%	8,3%	8,3%	83,3%	8,3%
2	37,5%	37,5%	25%	12,5%	87,5%	0%	0%	100%	0%
3	41,2%	47,1%	11,7%	11,8%	82,3%	5,9%	0%	100%	0%
4	45,5%	45,5%	9%	9,1%	81,8%	9,1%	0%	100%	0%

	RICERCA LE FEMMINE			ATTIVITA' NOTTURNA			SEDENTARIETA'		
	Si	NO	NON SO	Si	NO	NON SO	BASSA	MEDIA	ALTA
0	45,5%	18,2%	36,3%	54,5%	27,3%	18,2%	22,2%	66,7%	11,1%
1	25%	33,3%	41,7%	50%	41,7%	8,3%	0%	91,7%	8,3%
2	18,8%	43,7%	37,5%	50%	50%	0%	18,8%	68,7%	12,5%
3	0%	58,8%	41,2%	29,4%	41,2%	29,4%	0%	94,1%	5,9%
4	0%	80%	20%	40%	40%	20%	0%	90,9%	9,1%

	VOCALIZZAZIONI			ODORE PUNGENTE URINE			MARCATURE FACCIALI		
	Si	NO	NON SO	Si	NO	NON SO	Si	NO	NON SO
0	81,8%	9,1%	9,1%	72,7%	18,2%	9,1%	72,7%	18,2%	9,1%
1	75%	25%	0%	25%	75%	0%	83,3%	16,7%	0%
2	37,5%	37,5%	25%	18,7%	81,3%	0%	87,5%	12,5%	0%
3	41,2%	47,1%	11,7%	0%	88,2%	11,8%	82,4%	11,8%	5,8%
4	45,5%	45,5%	9%	9,1%	90,9%	0%	90,9%	9,1%	0%

	GRAFFIATURE		QUANTO SI ALLONTANA DA CASA				GIOCO		
	Si	NO	VICINO CASA	NEI DINTORNI	SI ALLONTANA MOLTO	NON SO	NON SO	Si	NO
0	63,6%	36,4%	22,2%	22,2%	11,1%	44,5%	42,8%	81,8%	18,2%
1	66,7%	33,3%	0%	44,4%	11,2%	44,4%	16,7%	83,3%	16,7%
2	75%	25%	8,3%	75,1%	8,3%	8,3%	0%	93,7%	6,3%
3	76,5%	23,5%	13,3%	73,3%	6,7%	6,7%	0%	88,2%	11,8%
4	90,9%	9,1%	12,5%	87,5%	0%	0%	0%	90,9%	9,1%

	DIFENDE IL TERRITORIO		TOLLERANZA ALLE MANIPOLAZIONI			COMPORTAMENTO CON COSPECIFICI		
	Si	NO	GLI PIACCIONO	TOLLERA MAL VOLENTIERI	DIVENTA AGGRESSIVO	SOCIEVOLE	INDIFFERENTE	AGGRESSIVO
0	77,7%	22,3%	90,9%	9,1%	0%	66,6%	33,4%	0%
1	66,6%	33,4%	83,3%	16,7%	0%	70%	30%	0%
2	41,6%	58,4%	93,7%	6,3%	0%	85,7%	14,3%	0%
3	64,3%	35,7%	100%	0%	0%	68,7%	31,3%	0%
4	33,3%	66,7%	90,9%	9,1%	0%	90,9%	9,1%	0%

**Tab. 21** Frequenza delle risposte date dai proprietari di 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) al questionario N° 1 proposto alla visita pre-impianto e ai successivi controlli. La prima colonna identifica la classe di distanza dall'impianto: 0 giorno dell'impianto; 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni.

	GIOCO			COMPORTAMENTO SOCIALE CON COSPECIFICI			AGGRESSIVITA' VERSO COSPECIFICI		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
1	33,3%	8,3%	58,4%	8,3%	8,3%	83,4%	8,3%	16,6%	75,1%
2	43,7%	12,6%	43,7%	6,3%	25%	68,7%	0%	18,7%	81,3%
3	41,2%	0%	58,8%	5,9%	17,6%	76,5%	0%	5,9%	94,1%
4	33,3%	11,1%	55,6%	22,2%	22,2%	55,6%	0%	11,1%	88,9%
	AGGRESSIVITA' VERSO L'UOMO			ATTIVITA' GIORNALIERA			SEDENTARIETA'		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
1	0%	0%	100%	0%	33,3%	66,7%	50%	0%	50%
2	0%	6,2%	93,8%	6,3%	18,7%	75%	31,3%	0%	68,7%
3	0%	0%	100%	5,9%	5,9%	88,2%	47%	6%	47%
4	0%	0%	100%	0%	22,2%	77,8%	55,5%	0%	44,5%
	APPETITO			FREQUENZA ASSUNZIONE CIBO			QUANTITA' ALIMENTO AL GIORNO		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
1	33,4%	16,6%	50%	25%	8,3%	66,7%	25%	16,7%	58,3%
2	12,5%	0%	87,5%	18,8%	12,5%	68,7%	37,5%	0%	62,5%
3	35,3%	0%	64,7%	23,5%	0%	76,5%	47,1%	0%	52,9%
4	33,3%	2%	66,7%	11,1%	0%	88,9%	22,2%	0%	77,8%
	FREQUENZA MINZIONE			MODALITA' MINZIONE			LUOGO DI MINZIONE		
	↑	↓	=	A spruzzo	accucciato	Non so	UGUALE	DIVERSO	NON SO
1	16,6%	25%	58,4%	16,6%	33,4%	50%	50%	33,3%	16,7%
2	0%	18,8%	81,2%	0%	56,3%	43,7%	68,8%	0%	31,2%
3	0%	11,8%	88,2%	5,9%	58,8%	35,3%	64,7%	0%	35,3%
4	0%	22,2%	77,8%	11,1%	33,3%	55,6%	66,7%	0%	33,3%
	FREQUENZA DEFECAZIONE			ORE DI SONNO DURANTE LA GIORNATA			ATTIVITA' NOTTURNA		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
1	0%	8,3%	91,7%	58,3%	0%	41,7%	0%	16,6%	83,4%
2	0%	0%	100%	37,5%	0%	62,5%	18,8%	18,8%	62,4%
3	0%	5,9%	94,1%	35,3%	0%	64,7%	11,8%	17,6%	70,6%
4	0%	11,1%	88,9%	66,6%	0%	33,4%	22,2%	22,2%	55,6%
	GRAFFIATURE			MARCATURE FACCIALI			CONTROLLO MORSO E ARTIGLI		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
1	0%	0%	100%	8,3%	0%	91,7%	0%	0%	100%
2	6,3%	12,5%	81,2%	18,8%	0%	81,2%	0%	0%	100%
3	11,7%	23,5%	64,8%	17,6%	17,6%	64,8%	17,6%	0%	82,4%
4	0%	22,2%	77,8%	22,2%	22,2%	55,6%	11,1%	0%	88,9%
	INTERESSE PER LE FEMMINE			VAGABONDAGGIO			ORE ACCESSO FUORI CASA		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
1	8,3%	25%	66,7%	0%	41,6%	58,4%	0%	16,6%	83,4%
2	0%	31,3%	68,7%	0%	18,8%	81,2%	0%	12,5%	87,5%
3	0%	41,2%	58,8%	5,9%	41,2%	52,9%	0%	5,9%	94,1%
4	0%	66,7%	33,3%	0%	33,3%	66,7%	0%	11,1%	88,9%
	QUANTO SI ALLONTANA DA CASA			ATTIVITA' SESSUALE			TERRITORIALITA'		
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=

	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
<b>1</b>	0%	25%	75%	0%	25%	75%	0%	16,7%	83,3%
<b>2</b>	6,3%	25%	68,7%	0%	31,3%	68,7%	0%	25%	75%
<b>3</b>	5,9%	29,4%	64,7%	0%	41,2%	58,8%	0%	5,9%	94,1%
<b>4</b>	0%	11,1%	88,9%	0%	44,4%	55,6%	0%	11,1%	88,9%
<b>MARCATURA DEL TERRITORIO</b>			<b>MINZIONE A SPRUZZO</b>			<b>MASTURBAZIONE</b>			
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
<b>1</b>	8,3%	41,7%	50%	0%	16,6%	83,4%	0%	25%	75%
<b>2</b>	0%	25%	75%	0%	31,3%	68,7%	0%	25%	75%
<b>3</b>	0%	29,4%	70,6%	0%	23,5%	76,5%	0%	17,6%	82,4%
<b>4</b>	11,1%	11,1%	77,8%	11,1%	11,1%	77,8%	0%	33,3%	66,7%
<b>MONTA OGGETTI/PERSONE</b>			<b>CACCIA</b>			<b>AFFETTUOSITA'</b>			
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
<b>1</b>	0%	16,6%	83,4%	8,3%	8,3%	83,4%	66,6%	0%	33,4%
<b>2</b>	0%	18,8%	81,2%	25%	6,3%	68,7%	81,3%	0%	18,7%
<b>3</b>	0%	5,9%	94,1%	29,4%	5,9%	64,7%	58,8%	0%	41,2%
<b>4</b>	0%	11,1%	88,9%	11,1%	11,1%	77,8%	55,5%	0%	44,5%
<b>ODORE DELLE URINE</b>			<b>STATO NUTRIZIONALE</b>			<b>VOCALIZZAZIONI</b>			
	↑	↓	=	↑	↓	=	↑	↓	=
<b>1</b>	8,3%	58,3%	33,4%	25%	0%	75%	16,6%	33,4%	50%
<b>2</b>	0%	56,3%	43,7%	37,5%	12,5%	50%	0%	37,5%	62,5%
<b>3</b>	0%	58,8%	41,2%	53%	23,5%	23,5%	0%	29,4%	70,6%
<b>4</b>	11,2%	44,4%	44,4%	66,6%	0%	33,4%	22,2%	33,3%	44,5%

**Tab. 22** Frequenza delle risposte date dai proprietari di 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) al questionario N° 2 proposto alle visite post-impianto. La prima colonna identifica la classe di distanza dall'impianto: 1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 e <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 e < 180 giorni dall'impianto; 4 ≥ 180 giorni dall'impianto. ↑ indica quando il dato parametro è aumentato; ↓ indica quando il parametro è diminuito; = indica quando il parametro è rimasto uguale.

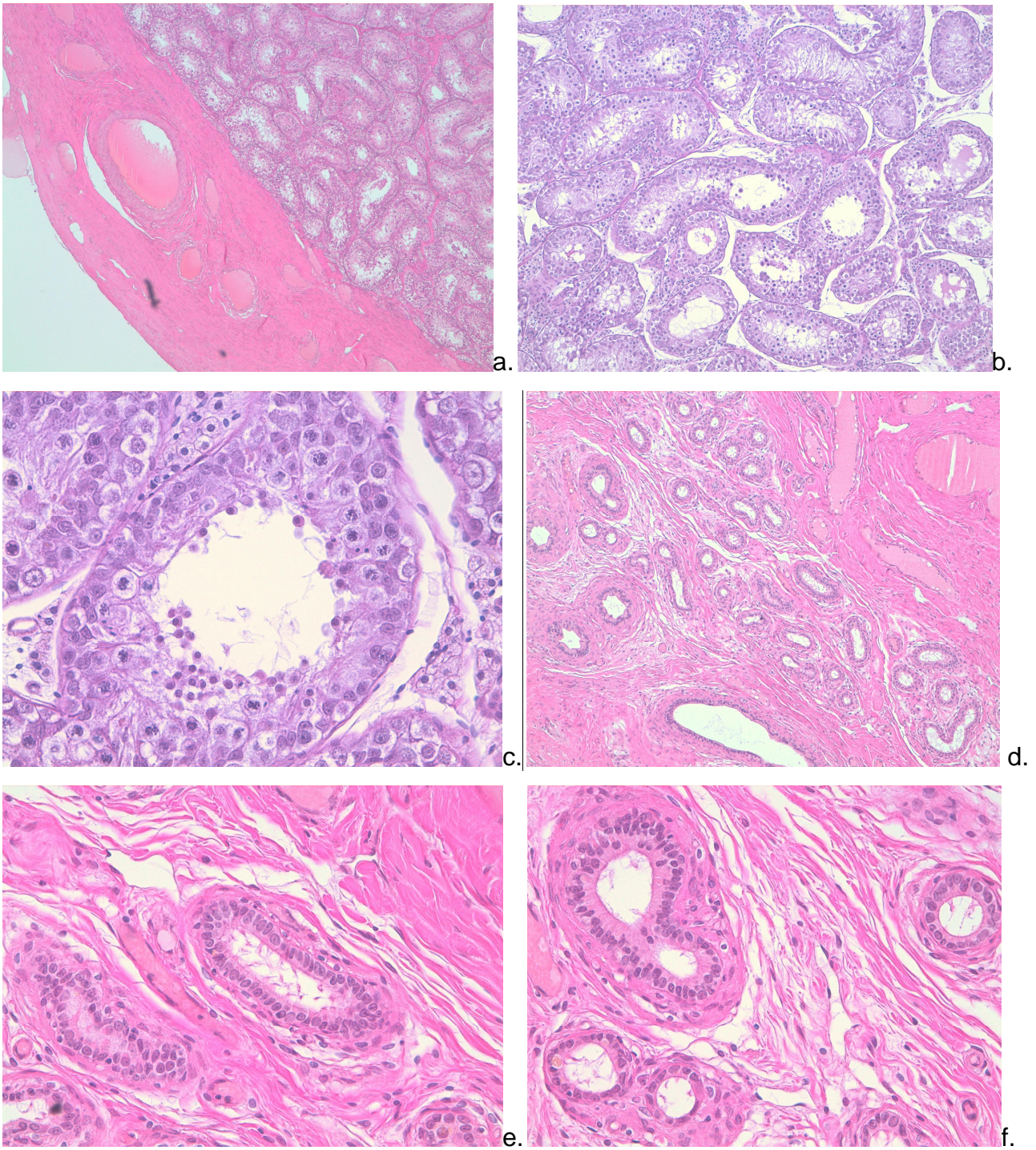
### 3.6 ESAME ISTOLOGICO TESTICOLI SOGGETTO 12

Il soggetto n°12 a 348 giorni dall'impianto (11 mesi e mezzo) è stato castrato chirurgicamente. La principale ragione per cui è stato effettuato l'intervento chirurgico è stato il ritorno di comportamenti tipici del gatto maschio intero. Nonostante un primo effetto del trattamento sul comportamento del soggetto, circa dal decimo mese dall'impianto il soggetto ha ripreso a marcare fortemente il territorio spruzzando urina in casa fuori dalla cassetta igienica. Inoltre la proprietaria ha riferito alcuni tentativi di accoppiamenti con gatte che erano recentemente entrate in calore.

L'ultimo dosaggio di testosterone dopo stimolo con GnRH di questo soggetto è stato eseguito a 322 giorni (10 mesi e mezzo) ed è risultato <0,1 ng/ml. All'esame riproduttivo effettuato il giorno della castrazione non sono state evidenziate le spicole peniene che

erano risultate scomparse già a partire dal quarto mese post-impianto, ma si è notato un lieve aumento delle dimensioni testicolari rispetto alla visita precedente (252 giorni dall'impianto). La proprietaria ha riferito che, anche dopo la castrazione chirurgica, si sono verificati degli episodi di marcatura del territorio. Da queste evidenze si può dedurre che tali comportamenti non erano legati alla mancata azione del farmaco ma probabilmente al ruolo dominante del soggetto.

Il referto dell'analisi istologica dei testicoli ha evidenziato una diffusa moderata atrofia testicolare. Dall'osservazione della sezione di tessuto testicolare infatti si osservano tubuli di ridotte dimensioni con diffusa moderata atrofia dell'epitelio germinale con alcuni spermatogoni evidenti ma assenza di spermatociti e spermatidi. In associazione si rileva un minimo ispessimento della membrana basale dei tubuli seminiferi. Nell'interstizio si osservano gruppi di cellule del Leydig lievemente vacuolizzate. Nel lume epididimale non sono visibili spermatozoi. I vasi del dotto deferente appaiono congesti.



**Figure 14.** Esame istologico dei testicoli di un gatto trattato con deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) dopo castrazione avvenuta a 11 mesi e mezzo dall'impianto. Le figure **a.**, **b.** e **c.** rappresentano i tubuli seminiferi di ridotte dimensioni con moderata atrofia dell'epitelio germinale con alcuni spermatogoni evidenti ma assenza di spermatoцити e spermatoиди. Le figure **d.**, **e.** ed **f.** riportano il lume dell'epididimo con assenza di spermatozoї al suo interno.

## 4.DISCUSSIONE

Lo studio condotto su 12 gatti maschi interi post-puberi trattati con un impianto sottocutaneo di deslorelin da 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) ha permesso di valutare i parametri fisiologici (peso, stato di salute generale ecc.), gli aspetti riproduttivi (testosteronemia, misure testicolari, presenza di spicole, produzione spermatica ecc.) e la percezione del proprietario sulle abitudini comportamentali degli animali trattati per un periodo di tempo variabile (range 40 giorni-13 mesi). L'impianto di deslorelin da 9.4 mg è risultato efficace in tutti i gatti, determinando cambiamenti repentini sia nella produzione di testosterone sia per quanto riguarda la riduzione delle dimensioni testicolari e la scomparsa dei caratteri sessuali secondari.

L'impianto di deslorelin permette il rilascio progressivo del farmaco dalla matrice lipidica andando a legarsi ai recettori del GnRH con una forza di legame circa 100 volte maggiore del GnRH stesso (Padua 2005). Il rilascio continuo di questo superagonista determina un'iniziale fase di ipersecrezione di gonadotropine (FSH e LH) grazie alla sua azione di stimolazione ipofisaria, per poi indurre un blocco della sintesi e rilascio di queste molecole inducendo la soppressione della fertilità dell'animale trattato (Trigg et al. 2001, 2006; Riesenbeck et al. 2002; Romagnoli et al. 2005; Junaidi et al. 2007). I livelli di testosterone nel sangue infatti tendono ad aumentare nelle prime 24 ore per poi tornare a livelli basali 7 giorni dopo l'impianto (Junaidi et al. 2007). In uno studio (Goericke-Pesch et al. 2011) effettuato su 10 gatti maschi interi trattati con un impianto di deslorelin da 4.7 mg, per esempio, alla rilevazione del livello sierico di testosterone vi è stata l'evidenza di un leggero incremento di questo parametro con il raggiungimento del picco massimo del 15,5% a 2 giorni dal trattamento. La concentrazione media dell'ormone si è poi ridotta significativamente a 28 giorni dalla somministrazione dell'impianto ottenendo un valore di testosterone <0,1 ng/ml in tutti i gatti, tranne uno, all'undicesima settimana dal trattamento. Nel caso dei gatti presi in considerazione nella nostra sperimentazione non è stata rilevata l'iniziale stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo e quindi l'aumento del testosterone sierico nelle prime 24 ore, in quanto il nostro studio non è stato impostato per il rilevamento delle concentrazioni ormonali nei primi giorni post-trattamento e il primo dosaggio è stato effettuato minimo a 14 giorni dopo l'impianto.

La media dei livelli di testosteronemia post-stimolo con GnRH alla visita prima dell'impianto (classe 0) è risultata statisticamente diversa rispetto a quella dei valori relativi alle altre classi di distanza, ma non è risultata alcuna variazione significativa tra le classi



successive. Questo risultato sta ad indicare che vi è stata una caduta delle concentrazioni sieriche dell'ormone alle visite post-impianto rispetto alla prima visita, ma poi i livelli di testosteronemia si sono mantenuti alla quota basale senza mostrare variazioni nonostante la somministrazione del GnRH. Vi è inoltre da sottolineare nei risultati delle analisi statistiche la presenza di una correlazione negativa e significativa tra il parametro testosterone post-stimolazione e i giorni di distanza dall'impianto, indicando che la risposta delle gonadi all'LH diminuisce in maniera rilevante con il passare dei giorni. C'è da notare però che la correlazione lineare prende in considerazione tutti i valori di testosteronemia rilevati alle varie classi di distanza e quindi dà un'informazione relativa al gruppo di soggetti e non all'effetto del farmaco sul singolo animale trattato. A questo proposito, infatti, c'è da notare un, seppur lieve, aumento graduale delle concentrazioni di testosterone post-GnRH in due soggetti (0.21 e 0.48 ng/ml in Porthos e Zeus) alla classe 4 (>180 giorni dall'impianto) che potrebbe in teoria far presupporre a una possibile ripresa della funzionalità testicolare. Quest'evidenza però non è stata supportata da un concomitante aumento delle dimensioni testicolari o dalla ricomparsa delle spicole a livello di mucosa peniena.

Il calo della testosteronemia, osservato in tutti i soggetti, fa pensare che ci sia stata una perdita nella sensibilità o nel numero dei recettori ipofisari del GnRH in risposta al continuo rilascio del principio attivo del farmaco e che si sia ottenuta quindi la soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare. La rapida caduta delle concentrazioni di testosterone è probabilmente legata dunque alla riduzione dell'LH e dell'FSH indotta dalla desensibilizzazione dell'ipofisi al GnRH come dimostrato da Ludwig et al.(2009) e Goericke-Pesch et al. (2009).

La concentrazione di testosterone nel sangue ha un pattern di tipo episodico all'interno delle 24 ore. Studi contrastanti ipotizzano la presenza (Johnstone et al. 1984) o l'assenza (Kirkpatrick, 1985; Tsutsui et al., 1990) di un effetto della stagione riproduttiva sulle concentrazioni circolanti dell'ormone nel gatto. Il range fisiologico di testosteronemia basale nel gatto maschio intero è di 0- 23,5 ng/ml (Johnstone et al. 1984). I dati relativi a questo parametro alla prima visita dei gatti di questo studio rientrano all'interno di questo range.

C'è da sottolineare che i livelli di testosterone nel circolo periferico sono inferiori rispetto a quelli esistenti a livello di vene testicolari, ma esiste una relazione significativa tra questi due valori (Tsutsui et al, 1990). La determinazione delle concentrazioni del testosterone a livello periferico dà utili informazioni riguardo la secrezione testicolare di quest'ormone.

Sebbene la secrezione anomala del testosterone possa essere un indicatore della disfunzione testicolare nel gatto (Howard et al., 1990), i dosaggi della testosteronemia basale sono difficili da interpretare a causa della secrezione di natura pulsatile e del comune ritrovamento di concentrazioni non determinabili ( $<0,1$  ng/ml) anche in gatti maschi interi (Johnstone et al., 1984; Tsutsui et al., 1990). Per questo motivo è necessaria la stimolazione della secrezione di testosterone mediante somministrazione di GnRH (50 mcg) o hCG (Human chorionic gonadotropin) (250 UI) per la valutazione della funzionalità testicolare. Il prelievo dopo 1 ora per il GnRH o dopo 4 ore per l'hCG infatti rileva la massima concentrazione di testosterone nel sangue, in quanto queste molecole inducono un aumento delle concentrazioni sieriche dell'ormone rispetto al valore basale. Dallo studio effettuato nel 2011 da De Gier et al. è stato documentato che, alla somministrazione di GnRH (gonadorelina Fertagyl, Intervet 10 mcg/kg) in cani maschi e femmine interi, risultava un aumento significativo delle concentrazioni plasmatiche di testosterone in entrambi i sessi. La stessa somministrazione in soggetti castrati non causava lo stesso aumento sierico dell'androgeno sia nei maschi che nelle femmine, indicando che le gonadi sono il sito principale di rilascio in circolo di quest'ormone. La concentrazione massima di testosterone dopo stimolazione con GnRH nei soggetti castrati è stata comunque inferiore alla concentrazione più bassa dei livelli di testosterone basale nei soggetti interi. Questo suggerisce che una singola misurazione della testosteronemia post-stimolazione può verificare realmente il grado di funzionalità testicolare nel cane maschio. In alcuni casi nei soggetti castrati i livelli di testosterone nel sangue post-stimolo sono risultati bassi ma spesso ancora a livelli determinabili, indicando la produzione dell'ormone anche da sedi extragonadiche, come la zona reticolare della corteccia surrenalica. Anche nel nostro studio in alcuni casi ai controlli post-impianto sono stati determinati livelli di testosterone  $>0,1$  ng/ml (come nel soggetto numero 6) imputabili alla stessa ragione o alla risposta, seppur molto ridotta, dei testicoli al GnRH nonostante l'effetto soppressivo dell'impianto. Anche lo studio effettuato da Johnstone et al. del 1984 ha riportato la diminuzione della concentrazione plasmatica di testosterone fino a livelli compresi tra 0 e  $0,5$  ng/ml nei gatti maschi dopo castrazione. Ciò dimostra come il testicolo sia la sede primaria di produzione e secrezione di quest'ormone. Il fatto che dalla nostra sperimentazione alle visite post-impianto il livello sierico dell'androgeno dopo stimolazione sia risultato, in quasi tutti i casi, inferiore al limite di determinazione ( $<0,1$  ng/ml) fa desumere che si fosse instaurata un'insufficiente risposta dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo determinata dall'effetto del deslorelin. Questo è in accordo sia con i risultati

ottenuti nei cani maschi, in cui si dimostra una caduta delle concentrazioni di testosterone pochi giorni dopo l'impianto dell'agonista del GnRH (Riesenbeck et al. 2002; Junaidi et al. 2003; Ludwig et al. 2009; Goericke-Pesch et al. 2009), sia per quanto riguarda altri studi nel gatto maschio (Goericke-Pesch et al. 2011; Novotny et al. 2012). Nello studio di Novotny et al. (2012), condotto su ventisette gatti maschi interi maturi impiantati con deslorelin 4.7 mg, si ebbe un risultato simile. Anche in questo caso infatti il livello di testosterone ad un mese dal trattamento risultò statisticamente differente ( $P < 0,05$ ) dai livelli iniziali così come i valori rilevati a 2 mesi.

Nel nostro studio, per quanto riguarda la differenza nella media della testosteronemia post-stimolo, questa si mantiene per tutte le classi di distanza rispetto alla classe 0 (pre-impianto). Nei risultati emersi dalle analisi statistiche c'è da notare una differenza significativa relativa alla media delle concentrazioni di testosterone post-stimolo e del delta T correlato tra le due classi d'età (giovani  $\leq 9$  mesi, adulti  $> 9$  mesi) all'interno della classe di distanza 0 (visita pre-impianto). Questo può essere dato dal fatto che, con l'aumentare dell'età, si ha la maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo con una conseguente maggiore risposta delle gonadi alla somministrazione del GnRH. Probabilmente alcuni soggetti erano appena entrati nella fase della pubertà, che normalmente viene raggiunta a 8-10 mesi d'età nel gatto maschio, e nonostante fossero già presenti i caratteri sessuali secondari si doveva ancora raggiungere la completa funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare. In bibliografia non ci sono dati relativi alla differenza di effetto del GnRH sulla testosteronemia in gatti pre e post-puberi.

Nel nostro studio si è rilevata la progressiva riduzione delle misure testicolari (lunghezza, spessore, volume) in funzione della distanza dalla prima visita raggiungendo percentuali di riduzione pari all'50% del volume iniziale alla classe di distanza 2 dall'impianto ( $\geq 40$  giorni e  $< 70$  giorni) e pari all'80% dopo i 180 giorni post-trattamento. Questo è stato verificato dai risultati delle analisi statistiche che hanno rivelato una differenza significativa relativa alle medie di lunghezza, spessore e volume testicolare all'interno delle classi di distanza e dagli indici di correlazione di Pearson negativi che si sono osservati tra classe di distanza e misure testicolari. Da questi risultati si può dedurre che, al calare della testosteronemia, si associa una proporzionale riduzione delle dimensioni testicolari. Ciò è facilmente spiegabile dalla mancata funzione trofica dell'ormone che non agisce più a tale livello a seguito della soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo causata dal deslorelin. Questi risultati confermano quelli ottenuti nei cani maschi indipendentemente dal tipo di

agonista del GnRH utilizzato (Ludwig et al. 2009). Anche gatti maschi trattati con deslorelin 4.7 mg hanno presentato una riduzione del volume testicolare significativa: in particolare nello studio di Goericke-Pesch et al. (2010) la riduzione delle misure testicolari è stata di circa il 60% in 12 settimane e di circa il 73% dopo 36 settimane; mentre da un altro studio sempre condotto su gatti maschi impiantati con deslorelin da 4.7 mg (Novotny et al. 2012) la riduzione è stata pari al 48%, 54% e 60% del volume iniziale rispettivamente a 2, 3 e 4 mesi post-trattamento. In un altro studio eseguito su 20 gatti maschi da Romagnoli et al. (2010), dopo l'impianto da 4.7 mg si è osservata la diminuzione di circa il 70% del volume testicolare in tutti i soggetti, tranne uno, al controllo a 90 giorni.

La differenza significativa che, per quanto riguarda le dimensioni testicolari, è stata evidenziata all'interno delle classi d'età (giovani  $\leq 9$  mesi, adulti  $> 9$  mesi), è facilmente intuibile in quanto il volume testicolare tende ad aumentare proporzionalmente all'età e soprattutto tra soggetti pre e post-puberi. I testicoli del gatto adulto hanno una dimensione di circa 15x10 mm (Aggugini et al, 1998) ed il loro peso varia da 2 a 4 grammi anche se dallo studio di Kirkpatrick et al. (1985) si è rilevato un pattern stagionale relativo al peso testicolare nei gatti maschi con dei valori che sono risultati significativamente più elevati in giugno rispetto a quelli di dicembre o marzo.

L'impianto di deslorelin da 9.4 mg ha portato alla scomparsa delle spicole peniene in tutti i gatti a 6 mesi post-trattamento. Per il 50% dei gatti questo carattere era già scomparso a 65 giorni e nei rimanenti soggetti tale caratteristica non è stata più rilevata dai 3 mesi ai 6 mesi dall'impianto. Per tutta la durata del monitoraggio le spicole poi sono rimaste assenti. È stato possibile documentare statisticamente la variazione di questo parametro dalle differenze significative che sono state evidenziate all'interno delle classi di distanza dall'impianto e dall'indice di correlazione positivo che si è ottenuto tra parametro spicole e classe di distanza. La correlazione è risultata positiva in quanto la classificazione di questo carattere ha previsto l'assegnazione di un numero crescente alla sua scomparsa. Le spicole, essendo un tipico carattere sessuale secondario (Nickel et al, 1979), sono un indicatore della presenza di testosterone nel gatto maschio e tendono a regredire al calo della testosteronemia. Normalmente compaiono a 12 settimane d'età e raggiungono la massima espressione nel gatto adulto (Aroston e Cooper, 1967).

L'effetto del farmaco su questo carattere può essere paragonato a quello dell'orchietomia che è normalmente seguita dalla sua scomparsa dopo sei settimane dall'intervento (Johnston et al, 2001). L'associazione delle spicole cornee alla presenza di elevate

concentrazioni di testosterone in circolo è stata sottolineata anche dai risultati di uno studio effettuato su gatti maschi castrati a cui sono stati somministrati androgeni (Aronson et al, 1967): a seguito delle somministrazioni le spicole sono ricomparse per poi regredire nuovamente dopo l'interruzione.

I risultati ottenuti dal nostro studio sono comparabili a quelli raggiunti nella sperimentazione di Goericke-Pesch et al. (2010) anche per quanto concerne le spicole peniene: infatti in questo studio il carattere è scomparso dopo  $9,4 \pm 1$  settimane dal trattamento. Anche negli studi di Romagnoli et al. (2010) e Novotny et al. (2012) si è notata la riduzione progressiva delle dimensioni testicolari e la scomparsa del carattere spicole dopo rispettivamente 3 e 4 mesi dall'impianto.

Dalla nostra sperimentazione è stato possibile valutare l'andamento della produzione spermatica su 7 dei 12 gatti, ai quali sono stati eseguiti dei prelievi di seme regolari il giorno dell'impianto e durante la prima fase di monitoraggio. Dai risultati ottenuti si è visto che:

- La fertilità può essere considerata ancora potenzialmente mantenuta (motilità  $\geq 20\%$ , spermatozoi morfologicamente normali  $\geq 30\%$ ) nel periodo post-trattamento ai giorni 40, 40, 40, 70, 33, 33 e 41 rispettivamente; questo è stato osservato nonostante una concomitante e rilevante riduzione delle spicole peniene e nonostante il dosaggio di una concentrazione sierica di testosterone  $< 0,1$  ng/ml in tutti e 7 i gatti.
- È stato possibile ottenere materiale seminale contenente spermatozoi non motili in 4 gatti (precedentemente considerati potenzialmente fertili avendo ottenuto eiaculati con una motilità  $\geq 40\%$ ) ai giorni 40, 48, 48 e 97 rispettivamente, deducendo quindi che l'effetto del farmaco si era esplicito in questi soggetti anche per quanto riguarda la fertilità.
- È stata rilevata la totale assenza di spermatozoi in 5 dei 7 soggetti, che erano stati considerati potenzialmente fertili prima del trattamento, dopo un periodo di 62-72 giorni post-impianto.
- Nel materiale seminale di 2 dei 7 soggetti erano ancora presenti spermatozoi morti ai prelievi effettuati a 97 e 111 giorni post-trattamento.

Dalla sperimentazione si è notato un divario temporale tra la caduta delle concentrazioni di testosterone e l'assenza di spermatozoi al prelievo di seme. Nonostante che in tutti questi soggetti, già alla prima visita post-impianto, si sia verificato l'effetto di soppressione dei livelli ormonali dell'androgeno si sono comunque ritrovati spermatozoi ancora a 97 e 111 giorni dall'impianto, seppur non motili. L'arresto della spermatogenesi che ha seguito il

calo del testosterone ha necessitato quindi di un periodo addizionale dopo la completa cessazione di secrezione del testosterone (<0,1 ng/ml). Questa evidenza potrebbe essere imputata ad una residua funzionalità testicolare nel primo periodo post-impianto sostenuta da una concentrazione di testosterone a livello testicolare più elevata rispetto a quella determinata a livello di sangue periferico. A livello dei tubuli seminiferi, infatti, l'espressione da parte delle cellule del Sertoli della proteina legante gli androgeni (ABP) potrebbe aver mantenuto a livello testicolare delle concentrazioni di testosterone tali da permettere il mantenimento di un certo grado di spermatogenesi, nonostante concentrazioni ormonali sotto i limiti di rilevamento nel circolo periferico. In alternativa la permanenza di spermatozoi in eiaculati eseguiti anche a molti giorni di distanza dall'impianto potrebbe far pensare alla riserva di spermatozoi presenti a livello epididimale che, una volta maturati, sono stati stoccati a questo livello e sono stati rilevati ai prelievi successivi all'impianto nonostante l'arresto della spermatogenesi. Il fatto che il transito epididimale duri 10-12 giorni e che gli ultimi spermatozoi trovati nell'eiaculato si sono rilevati al quarto mese dall'impianto ci fa desumere che ci sia stata comunque una funzionalità testicolare mantenuta nel primo periodo post-trattamento.

Il testosterone è indispensabile per la spermatogenesi in quanto agisce stimolando la divisione meiotica, la maturazione e la differenziazione degli spermatozoi. L'arresto della secrezione di testosterone induce il blocco della spermatogenesi ma lo stato di infertilità viene raggiunto in ritardo a causa del potenziale rilascio degli spermatozoi precedentemente prodotti e stoccati. Perché un gatto maschio trattato con deslorelin 9.4 mg dunque non sia più fertile e raggiunga la condizione di azoospermia (prerequisito della contraccezione) è richiesto un periodo addizionale dalla cessazione della secrezione di testosterone. Il periodo medio di scomparsa degli spermatozoi nel materiale seminale per i gatti seguiti nel nostro studio è stata di circa 65 giorni, non tenendo conto dei 2 soggetti che hanno continuato a presentarli. È presumibile pensare comunque che anche i due soggetti, che hanno continuato a presentare spermatozoi anche dopo i 3 mesi, abbiano raggiunto la condizione di azoospermia a seguito del calo della testosteronemia. C'è da notare che il soggetto che a 111 giorni presentava ancora spermatozoi è l'unico che non ha mai raggiunto livelli di testosterone inferiori alla soglia di rilevamento (<0,1 ng/ml) indicando la possibilità di una residua funzionalità testicolare.

La sperimentazione eseguita da Novotny et al. nel 2012, condotta su 27 gatti maschi impiantati con deslorelin 4.7 mg, riporta che la fertilità potrebbe essere mantenuta anche a distanza di 2-3 mesi post-impianto, in quanto sono stati rilevati spermatozoi a prelievi

eseguiti a questo intervallo, nonostante si fosse documentata una riduzione significativa nel numero totale di spermatozoi rispetto ai prelievi eseguiti prima del trattamento. Inoltre nello studio condotto da Goericke-Petch et al. nel 2010 uno dei gatti impiantati con deslorelin 4.7 mg si è accoppiato con una gatta in estro 20 giorni dopo la somministrazione ed è risultata una gravidanza. Un altro gatto, che presentava un livello di testosterone tra 0,1 e <0,1 ng/ml dal giorno 24, all'ottava settimana ha avuto un accoppiamento e si è rilevata la presenza di spermatozoi allo striscio vaginale della gatta, ma questa non è rimasta gravida. Nonostante questi dati relativamente scarsi, non ci sono studi focalizzati sull'identificazione dell'intervallo in cui gatti maschi impiantati con deslorelin raggiungono l'azoospermia. Per suggerire un utilizzo più sicuro del farmaco per la contraccezione anche nel gatto quindi sarebbero necessari ulteriori studi volti ad individuare il periodo medio necessario perché il soggetto trattato diventi sterile. La possibilità di ottenere seme potenzialmente fertile anche molti giorni dopo l'impianto è sicuramente un aspetto da tenere in considerazione nella gestione degli animali trattati nel momento in cui un proprietario volesse far convivere il soggetto con gatte non sterilizzate senza preoccuparsi di gravidanze indesiderate.

Da studi precedenti (Ponglowhapan et al. 2002, Juanidi et al. 2003; 2009) effettuati su cani maschi impiantati con deslorelin si è visto che l'azoospermia veniva ottenuta in un tempo variabile da 5 a 10 settimane dopo l'impianto. Trigg et al. (2006) hanno riportato che la sterilità nei cani maschi è stata raggiunta a 48 giorni post-trattamento, mentre Junaidi et al (2009) ha osservato la completa atrofia dei tubuli seminiferi nel 90% dei cani trattati a 41 giorni post trattamento. Questo però deve essere preso come intervallo indicativo in quanto nello studio di Romagnoli et al. del 2012 si è visto che cani maschi trattati con l'impianto a base di deslorelin da 4.7 mg (sito d'impianto interscapolare) possono presentare ancora materiale seminale potenzialmente fertile anche dopo 2 mesi post-trattamento.

Dai risultati da noi ottenuti sulla qualità del materiale seminale prima del trattamento i dati sono paragonabili a quelli già presenti in letteratura per il gatto (Axner e Linde-Forsberg, 2007). In studi precedenti la percentuale di spermatozoi progressivamente motili ottenuta da prelievi mediante elettroeiaculazione in gatti maschi è stata in media del 70% (Platz et al. 1978), 60% (Platz, Seager et al. 1978), 77% (Wildt et al. 1983), 65% (Dooley, Pineda 1986) e 84,4% (Howard et al. 1990). Rispetto a questi studi i risultati da noi ottenuti alla visita pre-impianto (quando l'impianto non poteva ancora aver influito su tale parametro)

hanno rilevato una media di percentuale di spermatozoi progressivamente motili molto inferiore (48,6%). Le valutazioni sulla motilità sono di rilevante importanza per determinare l'effetto del farmaco sulla fertilità del soggetto trattato ma devono essere prese in considerazione con attenzione in quanto molti fattori possono influenzare tale parametro tra cui, come prima cosa, la modalità di prelievo (Filliers et al. 2010), il tempo tra prelievo ed osservazione al microscopio, il possibile shock termico che avviene al contatto del materiale seminale con il vetrino oltre che l'esperienza dell'operatore che lo valuta.

Nel nostro studio non sono state evidenziate particolari modificazioni relative alla qualità seminale nel corso del monitoraggio. La media della percentuale della motilità progressiva non ha presentato differenze significative all'interno delle classi di distanza ma tale risultato è da imputarsi probabilmente al fatto che in alcuni soggetti vi è stata una progressiva riduzione di tale parametro con il susseguirsi delle visite, mentre in altri tale percentuale è rimasta pressoché invariata se non addirittura aumentata al primo prelievo post-impianto. Questo può essere messo in luce dall'osservazione dell'indice di deviazione standard che è aumentato considerevolmente alle classi di distanza 1-3 (1 <40 giorni dall'impianto; 2 ≥40 ma <70 giorni dall'impianto; 3 ≥ 70 ma < 180 giorni dall'impianto) rispetto alla visita pre-impianto (classe 0). C'è da dire quindi che, nonostante i risultati delle analisi statistiche, all'osservazione clinica dei dati ottenuti dalla valutazione del materiale seminale, in alcuni soggetti la motilità tende a diminuire con l'aumentare della distanza dall'impianto, avendo anche ottenuto un indice di Pearson negativo tendente alla significatività ( $P = 0,0501$ ) che correla questi due parametri. Questo può essere spiegato dal fatto che, con la riduzione della testosteronemia, vi è una riduzione della vitalità degli spermatozoi poiché questo ormone è responsabile della loro maturazione e del mantenimento della spermatogenesi. A questo riguardo lo studio condotto su sei cani maschi trattati con deslorelin 4.7 mg (Romagnoli et al. 2012) ha rivelato un aumento relativo della motilità all'intervallo di 9-17 giorni post-impianto e una successiva riduzione significativa dal giorno 23-32 in poi ( $P < 0,05$ ).

In letteratura non esistono lavori che valutino l'effetto dell'impianto di deslorelin sulla qualità seminale nel gatto anche se lo studio di Novotny et al. del 2012, condotto su 27 gatti maschi impiantati con deslorelin 4.7 mg, riporta che il seme raccolto ed esaminato ad un mese dall'impianto ha dimostrato un aumento nella conta spermatica totale per poi ridursi a 2 e 4 mesi post-trattamento. Da questo lavoro si desume anche che è possibile un rapido ritorno della spermatogenesi a seguito della rimozione dell'impianto in quanto all'esame del seme si è osservato un progressivo aumento del numero di spermatozoi



totali.

Alla valutazione morfologica degli strisci di seme la media degli spermatozoi morfologicamente anomali è stata circa del 40% per tutte le classi di distanza dall'impianto. Le analisi statistiche non hanno rivelato differenze all'interno di queste classi per quanto riguarda le varie percentuali di anomalie (anomalie della testa, del collo, della coda, teste staccate). Vi è stata però l'eccezione della percentuale di gocce citoplasmatiche che si sono significativamente ridotte ( $P < 0,05$ ) alla classe 1 e 2 rispetto alla classe 0 (giorno dell'impianto). Questa diminuzione può essere spiegata dal fatto che al primo prelievo i gatti probabilmente non avevano eiaculato da molto tempo, mentre i prelievi successivi sono stati eseguiti in media a meno di 40 giorni dal primo. Dato che l'anomalia della goccia citoplasmatica (in particolare quella che si trova distalmente a livello di coda dello spermatozoo) è collegata allo stato di "maturazione" degli spermatozoi, può essere che spermatozoi più vecchi siano stati eiaculati al primo prelievo in quanto stoccati da tanto tempo a livello epididimale, mentre ai prelievi successivi sono stati ritrovati spermatozoi relativamente più giovani. Alla valutazione morfologica però non è stata differenziata la localizzazione delle gocce citoplasmatiche (prossimali o distali) e questo ci impedisce di dare una spiegazione precisa alla tendenza evidenziata da questo indice.

Differenti lavori hanno riportato valori discordanti per quanto riguarda la media della percentuale di spermatozoi anomali nel gatto: da alcuni studi (Wildt et al. 1983; Howard et al. 1990) si è visto che normalmente il gatto domestico produce eiaculati contenenti una percentuale di spermatozoi anomali  $< 40\%$ , ma in altri (Axner et al. 1997, 1998) è stato dimostrato come questo valore possa risultare anche più elevato. È comunque difficile effettuare una comparazione sui risultati evidenziati da studi diversi per i metodi differenti di prelievo, fissaggio, colorazione e classificazione degli spermatozoi (Howard et al. 1990; Axner et al. 1997). Dallo studio effettuato da Axner et al. (2007) su 48 gatti maschi, per la definizione di un normale spermiogramma nel gatto, si è riportato che la media della percentuale di spermatozoi morfologicamente anomali è stata del 56% ottenendo solo nel 29% dei casi una percentuale  $< 40\%$ . Questo indica come non è inusuale per il gatto domestico trovare una bassa percentuale di spermatozoi normali come è stato anche evidenziato nei felidi selvatici (Howard 1993).

Vi sono pochi dati in letteratura per quanto riguarda la relazione tra qualità seminale e fertilità nei gatti. Uno dei pochi studi al riguardo è stato effettuato su una colonia felina da

Howard et al. (1993) ed ha riportato che gatti maschi con una percentuale di spermatozoi morfologicamente normali <40% ottenevano un tasso di penetrazione della zona pellucida inferiore rispetto a quelli che presentavano una percentuale >60%. Inoltre è stato documentato da altri studi che, non solo la percentuale di anomalie, ma anche il numero totale degli spermatozoi normali e motili influenza la fertilità (Schwartz et al. 1981; Mickelsen et al. 1993; Januskauskas et al. 1996). Nello studio di Muller et al. (2012), effettuato su 37 gatti maschi, è stato verificato che la riduzione del rapporto tra i livelli di testosterone ed estrogeni nel sangue sia significativamente associata ad un aumento delle anomalie morfologiche degli spermatozoi nell'ejaculato. Questo suggerisce che il bilancio tra androgeni ed estrogeni sia un fattore endocrino importante nella genesi della teratospermia nei felidi. Questo sembrerebbe essere in disaccordo con i risultati ottenuti dalla nostra sperimentazione in quanto, alla riduzione dei livelli di testosterone nel sangue, non si è rilevato un concomitante e significativo aumento della percentuale di anomalie degli spermatozoi, ma è possibile che sia necessario del tempo prima che, una volta variato il rapporto tra gli ormoni, si verifichino le alterazioni spermatiche. Le evidenze relative alla valutazione morfologica sono in accordo con quanto riportato nello studio di Romagnoli et al.(2012): in 6 cani maschi impiantati con deslorelin 4.7 mg la morfologia degli spermatozoi non è stata influenzata dal trattamento durante i primi 3 mesi.

In letteratura non ci sono dati riferibili al tempo di soppressione dell'attività riproduttiva nei gatti maschi impiantati con deslorelin 9.4 mg e dal nostro studio possiamo solo dire che in tutti i gatti l'effetto è ancora in atto (il monitoraggio è durato da 40 giorni a 13 mesi) non avendo ottenuto ancora un rialzo significativo della testosteronemia e la ricomparsa dei caratteri sessuali secondari. Lo studio comunque è ancora in fase di monitoraggio e ci si aspetta che l'effetto duri ancora a lungo.

Esistono precedenti lavori su gatti maschi impiantati con deslorelin 4.7 mg (Romagnoli et al. 2010) in cui si evidenzia l'effetto di soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare che si è instaurato già a 20-30 giorni dall'impianto e si è protratto per  $15 \pm 3$  mesi. Un altro studio (Goericke-Pesch et al. 2011) effettuato sempre con l'impianto da 4.7 mg nei gatti maschi ha ottenuto lo stesso effetto documentato per tutto il periodo di monitoraggio che è stato di 8 mesi. In questi studi (Geretto 2009, Goericke-Pesch et al. 2011, Romagnoli et al. nel 2010) si è evidenziato che in una piccola percentuale di soggetti trattati con l'impianto da 4.7 mg di deslorelin il farmaco non avesse avuto un effetto completo nella soppressione dell'attività riproduttiva e i livelli di testosterone post-stimolazione con GnRH fossero rimasti sopra il limite di rilevamento per un periodo più lungo rispetto agli altri

soggetti. Nella nostra sperimentazione (effettuata con l'impianto con dosaggio doppio) uno dei soggetti (Pepe) ha presentato dei livelli di testosterone post-stimolo con GnRH ridotti anche se appena sopra il limite di rilevamento. Le concentrazioni di testosterone rilevate sono state comunque molto basse, ovvero 0.51, 0.27, 0.23 e 0.24 ng/ml rispettivamente a 40, 111, 179 e 257 giorni post-impianto. Si tratta di valori indubbiamente insufficienti a supportare la funzione testicolare, come evidenziato dall'assenza di spicole peniene e dalla riduzione delle dimensioni testicolari e dalla presenza di spermatozoi non motili. La possibilità di una variabilità d'effetto dovuta ad una risposta individuale all'impianto dell'agonista del GnRH è stata osservata anche da Novotny et al. (2012) che, all'esame istologico dei testicoli di gatti trattati con l'impianto di deslorelin da 4.7 mg, hanno rilevato un grado variabile di soppressione della spermatogenesi a quattro mesi dall'impianto. A questo riguardo sarebbero necessari ulteriori studi per determinare la causa di questa risposta soggettiva al farmaco e la percentuale di soggetti in cui non avviene una completa inibizione della funzionalità gonadica.

Dall'osservazione delle risposte date dai proprietari ai questionari proposti ad ogni visita si è notata una tendenza alla riduzione di alcuni aspetti etologici quali la ricerca delle femmine, la territorialità, la minzione a spruzzo con urina odorosa e le vocalizzazioni, mentre vi è stato un aumento dell'affettuosità, della sedentarietà e dell'appetito. C'è da notare che questi cambiamenti non sono avvenuti per tutti i soggetti; infatti in alcuni casi (per esempio per i soggetti 6, 7 e 11) i gatti hanno mantenuto invariati alcuni comportamenti tipici del gatto maschio adulto quali la marcatura del territorio e i tentativi di monta di gatte in calore. In particolare il soggetto 11 "Petronio" è stato castrato chirurgicamente a 11 mesi e mezzo dall'impianto proprio per questo motivo, nonostante la proprietaria avesse notato una prima fase (primi mesi dopo l'impianto) in cui vi era stato un effetto del farmaco sul comportamento. Al momento della castrazione Petronio non presentava le spicole cornee a livello di mucosa peniena e il dosaggio del testosterone post-stimolo con GnRH, eseguito qualche giorno prima, era risultato inferiore ai limiti di determinazione (<0,1 ng/ml), facendo presumere che fosse un aspetto legato all'indole dominante del gatto. Tale supposizione è stata poi rimarcata dal fatto che il soggetto ha continuato a manifestare tali comportamenti anche dopo l'orchietomia.

Le osservazioni relative al modulo etologico non sono state valutate statisticamente ma sono il risultato di una valutazione descrittiva della frequenza delle risposte relative a prima e dopo il trattamento. Bisogna inoltre sottolineare il fatto che tali osservazioni

rispecchiano le impressioni dei proprietari riguardo il comportamento dei propri animali domestici che molte volte possono essere forvianti e non oggettive. Il fatto che siano per la maggior parte animali semi-randagi che vivono soprattutto fuori casa ci fa sospettare della reale affidabilità di questi dati. Nonostante ciò, queste osservazioni possono essere d'aiuto nell'avere un'idea generale sui possibili cambiamenti comportamentali avvenuti nei soggetti trattati.

Il fatto che l'impianto di deslorelin non abbia avuto effetto sull'aspetto etologico di alcuni gatti avvalorata la teoria ipotizzata da Hart nel 1973 in cui la castrazione di soggetti dominanti può non portare alla perdita delle caratteristiche etologiche tipiche del maschio adulto. Dagli studi di quest'autore i comportamenti relativi a caccia, esplorazione e marcatura non sono correlati tra loro e quindi un soggetto può presentare alcuni aspetti etologici ma non altri. Inoltre è stato evidenziato come non esista alcuna relazione tra età alla castrazione e tempo in cui vengono persi tali comportamenti ed è stato confermato come alla castrazione si venga a perdere il caratteristico odore pungente delle urine.

C'è da dire che nel nostro studio le impressioni dei proprietari hanno rilevato, seppur in una piccola percentuale di casi (8-16%), l'aumento di comportamenti quali vocalizzazioni, aggressività verso conspecifici, odore pungente delle urine, minzione a spruzzo e marcatura del territorio alla classe di distanza 1 (< 40 giorni dall'impianto) e 4 (>180 giorni dall'impianto). Relativamente alla classe 1 quest'evidenza può essere attribuita al così detto "flare effect" di stimolazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo che risulta in un temporaneo incremento dei livelli di testosterone, mentre per quanto riguarda la classe 4 è difficile trovare una spiegazione in quanto i livelli di testosteronemia non sono aumentati significativamente. La tendenza all'incremento di determinati aspetti etologici del gatto maschio nel primo periodo post-impianto è stata documentata anche in altri studi, per esempio quello eseguito da Romagnoli et al. (2010) e quello di Goericke-Pesch et al. (2010). In quest'ultimo l'effetto dell'impianto di deslorelin da 4.7 mg sul comportamento sessuale è stato statisticamente significativo. È stato osservato infatti un aumento della libido, degli accoppiamenti e delle monte a seguito del trattamento nelle prime due settimane, dopo le quali vi è stata una progressiva riduzione. Inoltre i gatti non hanno più marcato il territorio dopo la decima settimana e sono diventati tutti molto affettuosi.

Un altro aspetto interessante che è risaltato dai questionari nel nostro studio è stato la tendenza di aumento dell'appetito e della quantità di alimento assunta durante la giornata associata ad una riduzione dell'attività giornaliera e all'aumento della sedentarietà. Dal

punto di vista dei proprietari inoltre lo stato nutrizionale dei soggetti si è incrementato durante il periodo di monitoraggio nella maggior parte dei casi. Questa evidenza è in contrasto però con il risultato delle analisi statistiche che hanno rilevato solo una tendenza alla significatività ( $P=0,073$ ) per l'aumento del peso. È probabile che una maggiore numerosità del gruppo di animali sperimentali avrebbe consentito di ottenere risultati statisticamente significativi. In alcuni soggetti, infatti, l'aumento di peso è stato considerevole raggiungendo valori d'incremento anche pari al 60% del peso iniziale. A questo riguardo bisogna però considerare il fatto che più della metà dei soggetti al momento della prima visita avevano un'età inferiore ai 9 mesi e quindi erano ancora in una fase di sviluppo corporeo. Probabilmente la differenza tra l'aumento di peso tra soggetti in accrescimento e quelli già adulti risiede nella maggiore deposizione di grasso dei secondi, anche se questa è un'ipotesi difficile da verificare. Bisogna sottolineare inoltre la situazione particolare del soggetto 12 che al momento della prima visita presentava una storia clinica travagliata e quindi era in una condizione di costituzione e stato muscolare scadente. Con la risoluzione dei problemi di salute è migliorato molto, per quanto riguarda sviluppo scheletrico e tonicità muscolare, incrementando di molto il suo peso.

Anche dallo studio di Goericke-Pesch et al. (2011) la media del peso corporeo dei 10 gatti ,trattati con deslorelin 4.7 mg, non ha riportato differenze significative nel corso del monitoraggio, ma il test ANOVA ha rivelato una differenza significativa per il parametro appetito: comparato a prima del trattamento l'assunzione di cibo è aumentata in tutti i gatti, tranne due, a 7,5 mesi dall'impianto. A questo proposito un limite del nostro e degli altri studi è stato il fatto di non avere avuto un gruppo di controllo. Non è possibile quindi imputare con certezza questa tendenza d'incremento del peso e dell'appetito all'effetto del farmaco, anche se è riconosciuto l'effetto anabolizzante del testosterone (Aguggini et al. 1998), il cui calo può aver portato ad una riduzione del metabolismo basale fino ad un 30% (Belsito et al. 2009). È riconosciuto infatti come la castrazione, che induce il calo delle concentrazioni di testosterone, possa portare all'aumento del peso, noto come il peso e l'assunzione di cibo giornaliera aumentino in maniera significativa in gatti maschi dopo orchietomia rispetto ad un gruppo di controllo a cui è stato fornito lo stesso tipo di alimentazione (Fettman et al. 1997; Martin et al. 2006). Il parametro del peso però può essere influenzato da molti altri fattori quali il periodo dell'anno, temperatura ambientale, abitudini comportamentali, il possibile accesso fuori di casa, tipo e modalità di alimentazione ecc. C'è infatti da sottolineare come la tipologia di dieta influisca significativamente sull'aumento di peso nei soggetti castrati come è stato dimostrato da

Nguyen et al. (2004).

Dai risultati delle analisi statistiche del nostro studio si è evidenziata una differenza significativa per quanto riguarda la media del peso tra le classi d'età (giovani  $\leq 9$  mesi, vecchi  $> 9$  mesi) e questa variazione si è mantenuta all'interno delle classi di distanza dall'impianto. Questo dato può essere spiegato dal fatto che gli animali che al momento dell'impianto avevano un'età  $\leq 9$  mesi probabilmente erano ancora in una fase di sviluppo corporeo e dovevano ancora raggiungere il peso da adulti.

Dal nostro studio non sono state rilevate reazioni avverse al sito d'inoculo. C'è da notare però che la prima visita di controllo è stata effettuata in media a 20 giorni dall'impianto e quindi non è possibile escludere l'eventualità che si siano verificate durante i primi giorni. In letteratura non sono riportate particolari reazioni al sito d'impianto sia nel breve che nel lungo periodo anche se, in uno studio eseguito per una tesi da Geretto et al. (2009) in gatti maschi sottoposti ad impianto di deslorelin da 4.7 mg a livello interscapolare, è stato evidenziato un leggero arrossamento ed un moderato gonfiore al sito d'impianto in alcuni soggetti per circa 14 giorni.

## 5. CONCLUSIONI

Il farmaco (deslorelin 9.4 mg Suprelorin 12, Virbac) utilizzato nella nostra sperimentazione sottoforma d'impianto sottocutaneo a lento rilascio è risultato efficace nella soppressione dell'attività riproduttiva nei gatti maschi. L'efficacia è stata documentata dall'inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade con riduzione significativa della testosteronemia, dalla riduzione delle dimensioni testicolari e dalla scomparsa dei caratteri sessuali secondari in tutti i soggetti. Questi effetti si sono mantenuti in tutti i gatti maschi per tutto il periodo di monitoraggio che è stato di 40 giorni-13 mesi. Durante questo periodo la testosteronemia si è abbassata fino ai limiti di rilevamento ( $<0,1$  ng/ml) già dalle prime visite di controllo e si è mantenuta tale per tutto il periodo di monitoraggio in tutti i soggetti, tranne uno.

Gli effetti della somministrazione del GnRH sulla risposta dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolare, documentati dalla variazione delle concentrazioni di testosterone in circolo, sono stati paragonabili nelle due vie di somministrazione: via intramuscolare ed endovenosa.

La riduzione delle dimensioni testicolari è stata costante e progressiva durante tutto il periodo di monitoraggio ottenendo una percentuale di riduzione che ha raggiunto in media l'80% delle dimensioni originali a 180 giorni dall'impianto, dando conferma dell'efficacia del farmaco nell'indurre l'atrofia delle gonadi. Anche la scomparsa delle spicole peniene, ottenuta nel 50% dei soggetti in media a 65 giorni dall'impianto e nel 100% a 6 mesi post-trattamento, è stata un'ulteriore riprova dell'efficienza del farmaco.

In 5 dei 12 soggetti è stato possibile verificare la condizione di azoospermia in prelievi effettuati in media a 2 mesi dall'impianto, mentre in 2 soggetti si è documentata la permanenza di spermatozoi, seppur non motili, anche a prelievi effettuati dopo i 2 mesi. Non è stato possibile identificare esattamente il periodo medio di raggiungimento della condizione di azoospermia in tutti i soggetti, condizione necessaria per garantire l'infertilità. Possiamo quindi dire che gatti maschi adulti impiantati con deslorelin 9.4 mg possono rimanere potenzialmente fertili per 1-2 mesi post-trattamento e che tra il secondo e il quarto mese possono ancora essere trovati spermatozoi, seppur non motili, nell'eiaculato. Vi è un intervallo temporale tra la caduta delle concentrazioni di testosterone, la regressione delle spicole peniene e la scomparsa degli spermatozoi nell'eiaculato. Si può quindi affermare che il dosaggio di testosterone inferiore al limite di rilevamento e la mancata evidenziazione delle spicole non rappresentano degli indicatori affidabili della sterilità nei gatti maschi impiantati con deslorelin 9.4 mg. Lo studio ha

rivelato che è necessaria un'associazione di più esami, includendo la misurazione delle dimensioni testicolari, l'evidenziazione dei caratteri sessuali secondari, il monitoraggio dei cambiamenti ormonali e l'analisi del seme, per dichiarare non fertile un soggetto impiantato con deslorelin. È stato dimostrato inoltre che la procedura di prelievo di seme mediante somministrazione di medetomidina e cateterizzazione uretrale è una tecnica efficace per l'ottenimento del materiale seminale nel gatto maschio, nonostante alcuni limiti.

Dallo studio si è rimarcata la sicurezza del farmaco, in quanto non sono state evidenziate reazioni macroscopiche al sito d'impianto, né sono state rilevate condizioni patologiche riconducibili al farmaco durante tutto il periodo di monitoraggio. Entrambe le localizzazioni del sito d'impianto (interscapolare ed ombelicale) si sono rivelate adatte per l'ottenimento dell'effetto farmacologico del deslorelin. Quindi la sede di localizzazione ombelicale è da considerarsi sovrapponibile a quella interscapolare e potrebbe essere preferibile nel caso in cui il proprietario non escluda la possibilità di ritorno anticipato all'attività riproduttiva, in quanto si ritiene che la rimozione dell'impianto sia più facile in questa zona. Questo aspetto comunque non è stato valutato a fondo nel nostro studio.

È stata evidenziata la praticità di utilizzo di questa tipologia di farmaco in quanto l'inserimento dell'impianto non è particolarmente doloroso e non è stata necessaria alcuna sedazione.

Dal punto di vista etologico esistono comportamenti legati alla sfera riproduttiva che possono essere per molte persone fonte di disagio, soprattutto se l'animale vive in casa, come la marcatura del territorio, l'odore particolarmente sgradevole dell'urina, i miagolii continui ecc. Il fatto che dal nostro studio i proprietari abbiano rilevato una variazione nel senso della riduzione di questi atteggiamenti può portare a consigliare l'utilizzo di questo farmaco per trattare questo tipo di problemi. C'è da sottolineare però il fatto che tale effetto sul comportamento non è avvenuto in tutti i soggetti.

I gatti trattati non hanno mostrato variazioni significative del peso dopo l'impianto. Si può quindi asserire che, diversamente da quello che accade negli animali castrati chirurgicamente, gatti maschi trattati con deslorelin 9.4 mg non presentano un aumento del rischio di obesità nel breve periodo. Non è però da escludere l'eventualità che nel lungo periodo ci possa essere una tendenza all'incremento del peso.

Tutte queste evidenze ci portano a sottolineare l'utilità che può avere tale farmaco nella gestione della sfera riproduttiva nel gatto maschio. Può essere infatti un'utile alternativa alla castrazione chirurgica per soggetti che presentano controindicazioni all'anestesia



(problemi cardiaci, renali ecc.) o nel caso in cui il proprietario fosse per qualche motivo contrario all'intervento. La possibilità di garantire una totale reversibilità dell'effetto con deslorelin 9.4 mg (Suprelorin 12, Virbac) è di sicuro vantaggio nei casi in cui il proprietario non escluda il possibile utilizzo dell'animale come riproduttore nel futuro, anche se questo aspetto necessita di ulteriori approfondimenti nel gatto maschio. Questo accade spesso nel caso di allevamenti in cui per un certo periodo si vuole mettere "a riposo" un soggetto riproduttore per qualsiasi motivo.

# 6.ALLEGATI

## QUESTIONARIO N°1:

### 1. Come definirebbe il suo gatto:

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

### 2. Comportamento alimentare

Mangia tutto il cibo disponibile immediatamente o fa piccoli pasti?

- Tutto il cibo
- Piccoli pasti

Frequenza dei pasti:

- 1 volta al giorno
- 2 volte al giorno
- 3 o più volte al giorno

Quantità di cibo che assume durante la giornata.....

Come definirebbe l'appetito del gatto?

- Eccessivo
- Buono
- Scarso

### 3. Comportamento sessuale

Monta oggetti/persone?

- No mai
- solo persone
- solo oggetti
- entrambi

Emette comportamenti di masturbazione?

- Sì
- No

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

- 1
- 2
- 3
- Non so

Si è mai accoppiato?

- Sì
- No
- Non so

Se sì: data \_\_\_\_\_

numero accoppiamenti avvenuti:

- 1
- Più di uno

Ricerca le femmine?

- Sì
- No
- forse

#### 4. Sonno

È attivo di notte?

- Sì
- no

Quante ore dorme di giorno? \_\_\_\_\_

A che ora si sveglia la mattina? \_\_\_\_\_

Grado di sedentarietà: (1=bassa; 2=media; 3=alta)

- 1
- 2
- 3

#### 5. Comportamento eliminatorio e di marcatura

Dove urina/defeca normalmente?

- cassetta igienica
- fuori casa
- entrambe

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

- 1
- 2
- 3
- non so

Spruzza urina su superfici verticali?

- Sì
- No

Se sì, dove?

- In casa
- Fuori casa
- Entrambi

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

- 1
- 2
- 3
- non so

Emette vocalizzazioni?

- Sì
- No

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

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

- 1
- 2

- 3
- non so

Emette graffiature?

- Sì
- No

Su quale substrato? \_\_\_\_\_

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

- 1
- 2
- 3
- non so

Le urine hanno un odore pungente?

- Sì
- No

Struscia il muso su oggetti e superfici?

- Sì
- No

Su quale substrato? \_\_\_\_\_

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

- 1
- 2
- 3
- non so

## 6. Comportamento esplorativo e gioco

Ha accesso fuori dalla casa?

- Sì
- No

Se sì:

Quante ore al giorno passa fuori? \_\_\_\_\_

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

- 1
- 2
- 3
- non so

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

- Sì
- No

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

- 1
- 2
- 3
- non so

Gioca?

- Sì
- No

Se si:

Con chi/cosa?

- con oggetti
- con il proprietario
- entrambi

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

- 1
- 2
- 3
- non so

Caccia, porta prede?

- Sì
- No

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

- 1
- 2
- 3
- non so

## **7. Comportamento di aggressione**

È mai aggressivo nei confronti di persone o animali?

- Sì
- No

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

- 1
- 2
- 3
- non so

Dimostra di avere controllo del morso e degli artigli?

- Sì
- No

## **8. Altro**

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

- 1
- 2
- 3

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

- socievole
- indifferente
- aggressivo

Ha notato comportamenti particolari del gatto dopo aver cominciato il trattamento?

- Sì
- No

- Non so

Se si specificare che tipo di comportamento.....

Si lecca nel sito d'impianto (intrascapolare/periombelicale)?

- Si
- No
- Non so

Se si con che frequenza giornaliera? (indicare un valore da 1 a 3: 1=1 o 2 volte; 2= 3-5 volte, 3=> 5 volte)

- 1
- 2
- 3
- non so

Ha notato reazioni particolari al sito d'impianto (intrascapolare/periombelicale) es. arrossamento, prurito ecc.?

- si
- no
- non so

Se si specificare che tipo di reazione.....

**QUESTIONARIO N°2:**

<b>COMPORAMENTO DELL'ANIMALE</b>	<b>AUMENTATO</b>	<b>DIMINUITO</b>	<b>UGUALE</b>
Affettuosità			
Gioco			
Comportamento sociale nei confronti dei conspecifici			
Aggressività verso conspecifici			
Aggressività verso l'uomo			
Attività giornaliera			
sedentarietà			
<b>ALIMENTAZIONE</b>			
Appetito			
Frequenza assunzione cibo			
Quantità alimento/dì			
<b>FISIOLOGIA</b>			
Frequenza urinazione			
Modalità urinazione	A spruzzo	accucciato	Non so
Luogo d'urinazione/defecazione	uguale	Diverso(specificare)	Non so
Frequenza defecazione			
Ore di sonno durante la giornata			
Attività notturna			
Cambiamenti del pelo	si	no	forse
Stato nutrizionale (peso)			
Vocalizzazioni			
Graffiature			
Marcature facciali (struscia il muso su persone e oggetti)			
Controllo del morso e degli artigli			
Tolleranza alle manipolazioni del proprietario e di estranei			
Reazioni al sito d'impianto (prurito, rossore ecc.)	si	no	forse
<b>CARATTERISTICHE SESSUALI</b>			
Odore delle urine			
Interesse per le gatte			
Vagabondaggio			
Ore di accesso fuori casa			
Quanto si allontana da casa			
Attività sessuale (accoppiamenti)			
Comportamenti di territorialità (difesa del territorio)			
Marcatura del territorio			
Modalità di urinazione(a spruzzo)			
Masturbazione			
Monta oggetti e/o persone			
Caccia (porta prede)			

## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aguggini G, Beghelli V, Clement MG, D'Angelo A, De Benedetti A, Facello C, Giulio LF, Guglielmino R, Lucaroni A, Maffeo G, Marongiu A, Naitana S, Nuvoli P, Piazza R -Endocrinologia. In : Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. Unione Tipografico-Editrice Torinese (UTET) Torino. 1998
- Aronson LR, Cooper ML - Penile spines of the domestic cat: their endocrine-behavior relations. In: Anat Rec 157:71-78. 1967
- Axner E, Strom-Holst B, Linde-Forsberg C: Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. Theriogenology 50, 973– 979. 1998
- Axner E, Strom B, Linde-Forsberg C: Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. Theriogenology 47, 929–934. 1997
- Axner E e Forsberg Linde-Forsberg C- Sperm morphology in the domestic cat, and its relation with fertility: a retrospective study. In: Reprod Dom Anim 42, 282-291. 2007
- Axner E- Sperm maturation in the domestic cat. In: Theriogenology 66, 14-24. 2006
- Ball BA, Sabeur K, Nett T, Liu K: Effects of a GnRH cytotoxin on reproductive function in peripubertal male dogs. Theriogenology 66, 766–774. 2006
- Belsito KR, Vester BM, Keel T, Graves TK, Swanson KS - Impact of ovariectomy and food intake on body composition, physical activity, and adipose gene expression in cats. In: J Anim Sci. 87(2):594-602. 2009
- Bertschinger HJ, Asa CS, Calle PP, Long JA, Bauman K, DeMatteo K, Jöchle W, Trigg TE, Human A. Control of reproduction and sex related behaviour in exotic wild carnivores with the GnRH analogue deslorelin: preliminary observations. J Reprod Fertil ; Suppl 57:275– 83. 2001
- Beyler AL, Potts GO, Coulston F, Surrey AR. The selective testicular effects of certain bis-(dichloroacetyl) diamines. Endocrinology;69:819–33. 1961
- Courot M. Transport and maturation of spermatozoa in the epididymis of mammals. In: Bollack C, Clavert A, editors. Progress in reproductive biology, vol. 8, epididymis and fertility: biology and pathology. Basle, Switzerland: S. Karger;. p. 67–79.1981



- De Gier J, Buijtels JJCWM, Albers-Wolthers CHJ, Oei CHY, Kooistra HS, Okkens AC- Effects of gonadotropin-releasing hormone administration on the pituitary-gonadal axis in male and female dogs before and after gonadectomy. In: *Theriogenology*.15;77(5):967-78, 2011
- Dooley MP, Pineda MH: Effect of method of collection on seminal characteristics of the domestic cat. *Am J Vet Res* 47:286-292. 1986
- Dooley MP, Pineda MH, Hopper JG, Hsu WH. Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of cat during electroejaculation, collection of semen with an artificial vagina, and mating. *Am J Vet Res* 52, 687-91. 1991
- Fettman, C.A Stanton, L.L Banks, D.W Hamar . Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats. *Research in veterinary science* Volume 62, Issue 2, Pages 131–136. 1997
- Fillers M, Rijsselaere T, Bossaert P, Zambelli D, Anastasi P, Hoogewijs M, Van Soom A- In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: a comparison of two collection techniques. In: *Theriogenology* 74, 31-39. 2010
- Fontaine E e Fontbonne A- Clinical use of GnRH agonista in canine and feline species. In: *Reprod Dom Anim* 46, 344-353. 2011
- Fontaine E, Mir F, Vannier F, Gèrardin A, Albouy M, Navarro C, Fontbonne A – Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist. In: *Theriogenology*, 76(8): 1561-6. 2011
- Franca LR, Godinho CL. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the domestic cats (*Felis catus*). *Biol Reprod*;68:1554–61. 2003
- Garcia Romero G, Mattioli G, Rosa D, Diaz JD, Abeya M, Gobello C: A single administration of the GnRH antagonist acyline inhibits Basal and GnRH-stimulated serum testosterone concentrations in male dogs. *Reprod Dom Anim* 47, e32–e35. 2012
- Gerber HA, Jöchle W, Sulman FG. Control of reproduction and of undesirable social and sexual behaviour in dogs and cats. *J Small Anim Pract*;14:151– 8. 1973
- Geretto, Nicla. Controllo della riproduzione nel felino adulto con il deslorelin. Tesi Padua tesi. (2009)
- Gobello C, Herno G, Rodriguez R, et al. Use of the GnRH antagonist, acyline, on estrous cycle interruption in the bitch: a preliminary report. *Theriogenology*;64:13. 2005

- Goericke-Pesch S, Georgiev P, Antonov A, Albouy M, Wehrend A- Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin®, regarding suppression of reproductive function in tomcats. In: *Theriogenology* 75, 803-810. 2011
- Goericke-Pesch S, Ludwig C e Hoffman B- Developement of semen quality following reversibile downregulation of testicular function in male dogs with a GnRH agonist implant. In: *Reprod Dom Anim.* 2011
- Goericke-Pesch S, Spang A, Schulz M, Özalp G, Bergmann M, Ludwig C, Hoffmann B. Recrudescence of spermatogenesis in the dog following downregulation using a slow release GnRH agonist implant. *Reprod Dom Anim*;44 Suppl 2:302– 8. 2009
- Goericke-Pesch S, Plamen Georgievb, Anton Antonovb, Maxime Albouyc, Axel Wehrenda. Clinical efficacy of a GnRH-agonist implant containing 4.7 mg deslorelin, Suprelorin®, regarding suppression of reproductive function in tomcats.. *Theriogenology* 75 (2011) 803–810. 2010
- Harris TW, Wolchuk N. The suppression of estrus in the dog and cat with long-term administration of synthetic progestational steroids. *Am J Vet Res*;24:1003– 6. 1963
- Hart, B.L. and Barrett, R.E. Effects of castration on fighting, roaming, and urine spraying in adult male cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 163: 290-292. 1973
- Herbert CA, Trigg TE, Renfree MB, Shaw G, Eckery DC, Cooper DW. Long-term effects of deslorelin implants on reproduction in the female tammar wallaby (*Macropus eugenii*). *Reprod*;129:361–9. 2005
- Hoffmann B, 2005: New drugs to control canine and feline reproduction. FECAVA Voorjaarsdagen: International Congress, 15-17 April 2005: EVSSAR Precongress Day, April 14, p11-14. NTH, Amsterdam. pp. 11–14
- Howard JG, Brown JL, Bush M, Wildt DE: Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim-up processing. *J Androl* 11, 204–215. 1990
- Howard JG, Donoghue AM, Johnston LA, Wildt DE: Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biol Reprod* 49, 131–139. 1993
- Januskauskas A, So" derquist L, Ha° a° rd MG, Ha° a° rd MCh, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H: Influence of sperm number per straw on the post-thaw

- sperm viability and fertility of Swedish red and white AI bulls. *Acta Vet Scand* 37, 461–470. 1996
- Jay F. Kirkpatrick et al. Seasonal testosterone levels, testosterone clearance, and testicular weights in male domestic cats. *Canadian Journal of Zoology*, Vol. 63, No. 6 : pp. 1285-1287. 1985
  - Johnston D S, Root M V, Olson NS P- Ovarian and testicular function in the domestic cat: clinical management of spontaneous reproductive disease. In: *Anim Reprod Sci* 42, 261-274. 1996
  - Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS - Feline reproduction. In: *Canine and Feline Theriogenology*. Saunders,pp: 389-451; 2001
  - Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Prevention and termination of feline pregnancy. In: Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS, editors. *Canine and feline theriogenology*. WB Saunders, pp. 447–52. 2001
  - Johnstone IP, Bancroft BJ, McFarlane JR - Testosterone and androstenedione in the blood of the domestic tom cat. *Animal Reproduction Science*, 7:363-375,1984
  - Junaidi A, Williamson PE, Cummins JM, Martin GB, Blackberry MA, Trigg TE. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reprod Fertil Dev*;15:317–22. 2003
  - Junaidi A, Williamson PE, Trigg TE, Cummins JM, Martin GB, 2009: Morphological study of the effects of the GnRH superagonist deslorelin on the canine testis and prostate gland. *Reprod Domest Anim* 44, 757–763
  - Junaidi A., Williamson, P.E., Martin, G.B., Blackberry, M.A., Cummins, J.M. and Trigg, T.E. Dose-response studies for pituitary and testicular function in male dogs treated with the GnRH superagonist, deslorelin. *Reprod Dom Anim*. 44(5): 725-734. 2009
  - Junaidi, A., Williamson, P.E., Martin, G.B., Stanton, P.G., Blackberry, M.A., Cummins, J.M. and Trigg, T.E.. Pituitary and testicular endocrine responses to exogenous gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and luteinising hormone in male dogs treated with GnRH agonist implants. *Reprod Fertil Dev*. 19(8): 891-898. 2007
  - Kutzler M, Wood A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*;66:514–525. 2006

- Levy KJ, Miller LA, Crawford PC, Ritchey JW, Ross KM, Fagerstone KA- GnRH immunocontraception of male cats. In: *Theriogenology* 62, 1116-1130. 2004
- Ludwig C, Desmoulins PO, Driancourt MA, Goericke-Pesch S, Hoffmann B. Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) with the GnRH-Analagon Azagly-Nafarelin in form of a removable implant “Gonazon®”, a preclinical trial. *Theriogenology*;71: 1037–45. 2009
- May RM. Control of feline delinquency. *Nature*;332:392–3. 1988
- Martin LJ, Siliart B, Dumon HJ, Nguyen P. Spontaneous hormonal variations in male cats following gonadectomy. *Feline Med Surg*, 8(5): 309-14. 2006
- Mickelsen WD, Memon MA, Anderson PB, Freeman DA: The relationship of semen quality to pregnancy rate and litter size following artificial insemination in the bitch. *Theriogenology* 39, 553–560. 1993
- Müller G, Martino-Andrade AJ, Santos AS et al. Testicular testosterone: estradiol ratio in domestic cats and its relationship to spermatogenesis and epididymal sperm morphology. *Theriogenology*; 78(6):1224-34. 2012
- Munson L, Bauman JE, Asa CS, Jöchle W, Trigg TE. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *J Reprod Fertil Suppl*;57:269 –73. 2001
- Munson L, Chassy L, Asa C. Efficacy, safety and reversibility of bisdiamine as a male contraceptive in cats. *Theriogenology*;62:81–92. 2004
- Munson L. Contraception in felids. *Theriogenology*;66: 126–34. 2006
- Naz RK, Gupta SK, Gupta JC, et al. Recent advances in contraceptive vaccine development. *Hum Reprod*;20: 3271–83.2005
- Nguyen PG, Dumon HJ, Siliart BS, Martin LJ, Sergheraert R, Biourge VC - Effects of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in cats. *Am J Vet Res*. 65(12):1708-13. 2004
- Nickel R, Schummer A, Siferle E - Sistema nervoso centrale. In: *Trattato di Anatomia degli Animali Domestici vol IV*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano pp 138, 1988
- Novotny R, Cizek P, Vitasek R, Bartoskova A, Prinosilova P, Janosovska M – Reversible suppression of sexual activity in tomcats with deslorelin implant. In: *Theriogenology*. 2012

- Orgebin-Crist MC. Passage of spermatozoa labelled with thymidine-3H through the ductus epididymidis of the rabbit. *J Reprod Fertil*;10:241–51.1965
- Padula A.M.- GnRH analogues-agonists and antagonists. In: *Anim Reprod sci* 88, 115-126. 2005
- Platz CC, Seager SW: Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *J Am Vet Med Assoc* 173: 1353-1355, 1978
- Platz CC, Wildt DE, Seager SWJ: Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *J Reprod Fertil* 52:279-282, 1978
- Ponglowhapan S- Clinical application of GnRH agonist deslorelin in dogs and cats. In: *Thai J Vet Med Suppl.* 41, 59-63. 2011
- Ponglowhapan, S., Lohachit, C., Swangchan-uthai, T. and Trigg, T.E. Influences of subcutaneous deslorelin implantation on fertility in male dogs. *Reprod Dom Anim.* 37: 246. 2002
- Prohászik A, Kulcsár M, Trigg T, Driancourt MA, Huszenicza G. Comparison of four treatments to suppress ovarian activity in ferrets (*Mustela putorius furo*). *Vet Rec*;166:74–8. 2010
- Riesenbeck A, Klein R, Hoffmann B. Downregulation, a new and reversible approach to eliminate testicular function in the dog. *Prakt Tierarzt*;83:512–20. 2002
- Riesenbeck A, Klein R, Hoffmann B. Downregulation, a new and reversible approach to eliminate testicular function in the dog. *Prakt Tierarzt*;83:512–20.2002
- Romagnoli et al. Duration of control of reproductive function following administration of a single 4.7 mg Deslorelin implant in adult tomcats and effect on testicular histology 7th Congress European Vet Society Small Animal Reproduction, Milan (Italy) 11 March 2011
- Romagnoli et al., Prolonged Suppression of Reproductive Activity in Male Cats with a 4.7 Mg Implant of Deslorelin 4<sup>th</sup> Congress Alliance for Contraception in Cats and Dogs. Dallas (Texas, USA), April 2010
- Romagnoli S, Nassuato C, Stelletta C, Mollo A, Gelli D, 2005: Serum testosterone concentrations and scrotal diameter in male dogs treated with deslorelin implants. *Proceedings Symposium European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, Amsterdam, The Netherlands, April 14, pp 27–28.*
- Romagnoli S, Siminica A, Sontas BH, Milani C, Mollo A e Stelletta C – Semen quality and onset of sterility following administration of a 4.7 mg Deslorelin implant in adult male dogs. In: *Reprod Dom Anim* 47, 389-392. 2012

- Rubion S, Driancourt MA. Controlled delivery of a GnRH agonist by a silastic implant (Gonazon) results in long-term contraception in queens. *Reprod Domest Anim*;44:79–82. 2009
- Schoemaker NJ, van Deijk R, Muijlaert B, Kik MJ, Kuijten AM, de Jong FH, Trigg TE, Kruitwagen CL, Mol JA. Use of a gonadotropin releasing hormone agonist implant as an alternative for surgical castration in male ferrets (*Mustela putorius furo*). *Theriogenology* ; 70:161–7. 2008
- Schwartz D, McDonald PDM, Heuchel V: On the relationship between the number of spermatozoa and the probability of conception. *Reprod Nutr Dev* 21, 979–988. 1981
- Soderquist L, Janson L, Larsson K, Einarsson S. Sperm morphology and fertility in AI bulls. *J Vet Med A*;38: 534–43. 1991
- Sojka NJ, Jemings LL, Hamner CE. Artificial insemination in the cat (*Felis catus*). *Lab Anim Care* 20, 198-204. 1970
- Soto FR, Ferreira F, Pinheiro SR, et al. Adoption of shelter dogs in a Brazilian community: assessing the caretaker profile. *J Appl Anim Welfare Sci* ;8:105–16. 2005
- Taleporos P, Salgo MP, Oster G. Teratogenic action of bis(dichloroacetyl)diamine on rats: patterns of malformations produced in high incidence at time-limited periods of development. *Teratology*;18:5–16. 1978
- The Crisis of Pet Overpopulation. The Humane Society of the United States. [http://hsus.org/pets/issues\\_affecting\\_our\\_pets/pet\\_overpopulation\\_and\\_ownership\\_statistics/the\\_crisis\\_of\\_pet\\_overpopulation.html](http://hsus.org/pets/issues_affecting_our_pets/pet_overpopulation_and_ownership_statistics/the_crisis_of_pet_overpopulation.html), accessed January 23, 2006
- Thundathil J, Palasz AT, Barth AD, Mapletoft RJ. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Anim Reprod Sci*;65:181–92. 2001
- Trigg T, Yeates K: The development and use of deslorelin implants to suppress fertility- a synopsis and further advances. 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Vienna, Austria, 9th–11th July, pp. 265–266. 2008
- Trigg TE, Doyle AG, Walsh JD, Swangchanuthai T: A review of advances in the use of the GnRH agonist deslorelin in control of reproduction. *Theriogenology* 66, 1507–1512. 2006
- Trigg, T.E., Wright, P.J., Armour, A.F., Williamson, P.E., Junaidi, A., Martin, G.B., Doyle, A.G. and Walsh, J. Use of a GnRH analogue implant to produce reversible

- long-term suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 57: 255-261. 2001
- Tsusui toshihiko- Artificial insemination in domestic cats (*Felis catus*). In: *Theriogenology* 66, 122-125. 2006
  - Tsutsui T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A, Stabenfeldt GH - Androgen concentration in the blood and spermatogenic function of tom cats during the breeding season. In: *Jpn Vet Sci* 52: 801-806, 1990
  - Tsutsui T., F. Onodera, H. Oba, T. Mizunami, T. Hori- Plasma hormone levels and semen quality in male cats during non-breeding and breeding Seasons. In: *Reprod Dom Anim* 44 (Suppl. 2), 291-293. 2009
  - Wildt DE, Bush M, Howard JG, et al: Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod* 29:1019-1025, 1983
  - Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJO, Meltzer D, Van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ: Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod* 29, 1019–1025. 1983
  - Zambelli D e Cunto M- Semen collection in cats: techniques and analysis. In: *Theriogenology* 66, 159-165. 2006
  - Zambelli D, Merlo B, Iacono E, Joechler M, Cunto M- Effetto del dosaggio di medetomidina sulla qualità del seme di gatto prelevato mediante cateterismo uretrale dopo induzione farmacologica (ur.ca.p.i.). Atti del IX Congresso Nazionale S.I.R.A. (Società Italiana Riproduzione Animale) - Valenzano (Bari) 23-24/06/2011
  - Zambelli D., Cunto M., Prati F., Merlo B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electro-ejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology* 68, 796-803. 2007
  - Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B- Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. In: *Theriogenology* 69, 485-490. 2008
  - Zambelli D, Raccagni R, Cunto M, Andreani G, Isani G- Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma by electroejaculation and urethral catheterization. In: *theriogenology* 74, 1396-1402. 2010
  - Zaneveld LJD. Male Contraception: non-hormonal approaches. In: Cohn PN, Plotka ED, Seal US, editors. *Contraception in wildlife*. Lewiston NY: The Edwin Mellen Press; p. 21–72. 1987

- Zawistowski S, Morris J, Salman MD, Ruch-Gallie R. - Population dynamics, overpopulation, and the welfare of companion animals: new insights on old and new data. In: J Appl Anim Welf Sci 1(3):193-206. 1998



## 8. RINGRAZIAMENTI

Ai miei genitori e tutta la mia famiglia, per avermi sempre sostenuto in tutti questi anni di studio, sia economicamente che moralmente. In particolare grazie al mio babu che si è letto tutta la tesi e me l'ha corretta con tanto amore.

Alle mie nonne, a quella che fortunatamente è presente e a quella che purtroppo da poco ci ha lasciato: grazie per avermi aiutata a crescere e avermi sempre voluto bene.

Ai miei zii, sia quelli di Venezia sia quelli di Verona, che sono sempre stati presenti nella mia vita e mi hanno regalato tanti bei momenti.

Ai miei cuginetti che, anche se li vedo poco, ogni volta è un'emozione.

Alle mie amiche di Venezia (Andrèe e Ilaria) che sono state sempre presenti anche se per lunghi periodi non ci siamo potute vedere a causa degli impegni dell'università.

Alle mie compagne di banco (Federica e Michela) che mi hanno aiutato a fare molti esami passandomi i loro appunti quando mi serviva.

Alle mie coinquiline passate e presenti (Francesca, Capa, Giulia, Stefania) che, per prima cosa, sono le mie migliori amiche.

A Enrico con cui ho passato 3 anni bellissimi della mia vita.

Alle amiche acquisite negli ultimi anni Stefania, Giulia, Sonia, Barbara, Antea.

Ai compagni di tutti questi anni di Università Pauly, Clody, Giò, Thomas, Tommy, Bonny, Guerr, Tony e per finire Allegria e Marco: è stato un bellissimo periodo proprio perché ho potuto dividerlo con voi!

A Mario che, nonostante lo conosca da poco, ho capito che è una persona speciale.

A tutti i miei animaletti, molti dei quali non ci sono più, ma che mi hanno fatto scegliere questo percorso di vita: Milli, Tommy, Nerone e Orso.

Agli animaletti acquisiti: Ameli e Chochi.

A tutti quelli che mi hanno aiutato per la mia tesi: Valeria, Anna, Giulio, Michele, Andrea e tutti gli anestesisti. Senza di voi sicuramente non sarei qui adesso.

A tutte le persone che mi hanno permesso di portare avanti questo studio affidandomi i loro gatti.

A tutti i gatti del mio studio che ne hanno passate di tutti i colori e nonostante tutto sono sempre stati tranquilli ed affettuosi (a parte qualche eccezione).

Grazie..