

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze Medico Veterinarie

Ciclo XXVIII

LA RIPRODUZIONE NEI RETTILI: NUOVE PROSPETTIVE E SVILUPPI FUTURI

Coordinatore:

Chiar.mo Prof FRANCO BRINDANI

Tutor:

Chiar.mo Prof ENRICO PARMIGIANI

Dottorando:

**IGOR
PELIZZONE**

INDICE

❖ Abstract	pag. 3
1. Introduzione	pag. 9
2. Anatomia dell'apparato riproduttore	pag. 13
3. Cenni di fisiologia della riproduzione	
3.1.Ciclo estrale e ormoni	pag.18
3.2.Strategie riproduttive	pag. 22
3.3.Abitudini di accoppiamento e fertilizzazione	pag. 27
3.4.Inseminazione	pag. 33
3.5.Monitoraggio dello sviluppo delle uova e incubazione artificiale	pag. 34
4. Dimorfismo sessuale e tecniche di sessaggio	pag. 40
4.1.Principali metodi di sessaggio classici nei rettili	
4.1.1. <i>Eversione manuale degli emipeni</i>	pag.42
4.1.2. <i>Eversione idrostatica degli emipeni</i>	pag. 42
4.1.3. <i>Sonde cloacali</i>	pag. 43
4.1.4. <i>Radiografia, ecografia</i>	pag. 44
4.1.5. <i>Sessaggio tramite endoscopia della cavità celomatica.</i>	pag. 44
4.2.Metodi si sessaggio indiretti	
4.2.1. <i>Rilevamento della concentrazione degli ormoni sessuali</i>	pag. 47
4.2.2. <i>Determinazione del sesso geneticamente</i>	pag. 48

4.2.3. <i>Determinazione del sesso in base alla temperatura d'incubazione delle uova</i>	pag. 49
4.3. <i>Moderne tecniche di sessaggio dei principali rettili non dimorfici</i>	
4.3.1. <i>Ricerca degli emipeni tramite l'ecografia e la radiografia negli ofidi</i>	pag. 50
4.3.2. <i>Ricerca degli emipeni tramite la radiografia, l'ecografia e la tomografia computerizzata nei sauri</i>	pag. 52
4.3.3. <i>Cistoscopia nei cheloni neonati</i>	pag. 54
5. Principali patologie riproduttive	
5.1. <i>Morte embrionale</i>	pag. 59
5.2. <i>Distocia</i>	pag. 61
5.3. <i>Stasi follicolare</i>	pag. 68
5.4. <i>Prolasso</i>	pag. 70
5.5. <i>Anomalie del prodotto del concepimento</i>	pag. 73
6. Bibliografia	pag. 81

ABSTRACT:

Reptile captive breeding has been steadily growing in recent years and requires more advanced medical knowledge to deal with problems related to these animals. Deep knowledge of examined species is mandatory since most of reproductive problems of these animals are related to incorrect management.

Reproductive system of reptiles is various, depending on species considered. Lizards and snakes have two copulatory organs called hemipenis situated at the base of the tail, caudal to the cloacal opening that are everted alternately during mating. In these animals, renal posterior segment is called renal sexual segment, because it contributes to formation of seminal fluid. This portion, during breeding season becomes more voluminous and drastically changes in colour. Turtles have a single penis that is not involved in urination. In these animals testicles are two and are located inside coelomatic cavity cranioventrally to kidneys. Testicles can vary considerably both as shape as size depending on the time of year.

Reproductive cycle of reptiles is regulated, as well as in mammals, by steroid hormones. Variation of these hormones in blood has been studied by several authors that showed how the dosages variation determines alternation of reproductive cycle stages. Relationship between eggs and high levels of progesterone suggests that this hormone plays an important role in the reproduction of reptiles by stimulating oviducts vascularization during egg development. 17-beta estradiol has been described as vitellogenic hormone because of its ability to promote development of follicles and the formation of protective layers of the egg. Rising levels of estradiol observed during vitellogenic stage is directly responsible for the mobilization of maternal reserves at this stage of the cycle. It should be emphasized that the progesterone is in fact an antagonist of estradiol, reducing vitellogenesis and enhancing exchanges at level of maternal-foetal oviduct. Prostaglandins (PG) are a group of

molecules synthesized in several chemical forms. Numerous groups of prostaglandins are known and fish, amphibians, reptiles and mammals synthesize one or more prostaglandins starting from fatty acids precursors. Prostaglandins, in reptiles, increase the contractions of uterus and cause corpus luteal lysis.

Sexual maturity of reptiles, depends on size rather than age of animal. In captivity, nutrition and health of farm, can play a key role in achieving the necessary size for animals. Often, a captive animal reaches sexual maturity earlier than in nature. Most reptiles are oviparous and lay eggs with shells on the sand or in artificial nests. Ovoviviparity is found in some reptiles. Eggs, in this case, are retained within body, until birth of offspring. This can be seen as an evolutionary strategy of some animals, which under favourable weather conditions make the egg deposition, but if conditions does not allow it, retain eggs until the birth of offspring. Some snakes and lizards are viviparous, this means that embryo develops inside the body of the animal and that there is a placenta. Parthenogenesis is a form of asexual reproduction, in which the egg develops without fertilization. Thirty species of lizards and snakes can breed with this method. *Cnemidophorus uniparens* and *C. velox teselatus* alternating parthenogenesis to sexual reproduction, depending on availability of the male. Most reptiles shows no maternal care for eggs or for newborn who are abandoned at birth. There are exceptions to this general rule, in fact some species of pythons hatch the eggs until birth to protect them from predators and ensuring the right temperature and humidity.

In turtles, mating is related to season. In captivity, you need to reproduce these conditions to breed animals. Male during courtship is aggressive and before copulation bites head and legs of female. Behaviour during pregnancy is easily recognizable. Female is very agitated, is aggressive towards other females and start digging holes two weeks before deposition. Pregnant female builds the nest for several hours. He digs holes in the ground and lays eggs, covering them with soil and leaves with the hind limbs. Sometimes, turtles can arrest embryonic development of the offspring for years until

they find the right conditions to nest. Sperm also can be stored up to six years in the oviduct and deposition of fertilized eggs can occur without mating during reproductive cycle. Reproductive behaviour of all species of lizards mainly depend on seasonal variation and is related to changes of temperature and photoperiod. Fertilization is internal and during copulation, sperm is deposited in the anterior portion of female cloaca. Sperm move up, heading in the oviduct, in about 24-48 hours. In snakes species-specific pheromones play a key role in attracting partners, especially in colubrids. Before coupling male approaches the female and with his tongue capture pheromones. During ovulation, snakes will increase in volume in its rear half and muscle contractions will encourage movement of eggs in the oviducts. Sperm of reptiles is morphologically similar to those of mammals. Fertilization of eggs by sperm stored in female reproductive tract is usually possible even after months or years from coupling. Retention of male gametes is called *amphigonia retardata* and offers many benefits for survival of species.

Monitoring breeding animals can be useful to check possible management errors and to determine which the day for deposition is. Modern techniques of monitoring and experience gained in recent years can also estimate accurately follicular development to determine which the best time for mating is.

Sexual dimorphism is rare in snakes. Usually in males, tail appears to be wider than in female because in post-cloaca segment are housed hemipenis. Male is generally smaller than female. Many turtles are sexually dimorphic although the secondary sexual characteristics are not very significant in young and become more evident after puberty. In some species, you have to wait for more than 10 years before dimorphism is evident. In chelonian, males tend to have a large penis that can be everted in stressful situations. Sexually mature males of many species of turtles also tend to have a longer and thicker tail than females and distance between caudal edge of plastron and cloacal opening is larger than females. Although sex determination is often difficult in young animals, many lizards have

obvious sexual dimorphism when adult. However, also among lizards many species such as *Tiliqua scincoides*, *Tiliqua intermedia*, *Gerrhosaurus majors* and *Pogona vitticeps*, do not show obvious secondary sexual character. To ensure recognition of sex of animals have been developed techniques for sexing. Manual eversion of hemipenis is most common method used for sexing young snakes. Main limit of this technique is that it is trusted to 100% only in case of positive males. Hydrostatic eversion of hemipenis is similar to manual eversion, so it can be used only in snakes and some lizards. This procedure involves injection of sterile fluid (preferably isotonic saline) into tail caudally to hemipenis. This technique should be employed only in exceptional cases, because it is not risk-free. Cloacal probing is the main method for sexing adult ophidians and large lizards. Metal probes with blunt tip are gently introduced in cloaca, and pushed against the posterior wall of the cloaca. In males probe penetrates easily, in females not. X-rays can be useful for sexing some species of Monitor lizards (*Varanus achanturus*, *V. komodoensis*, *V. olivaceus*, *V. gouldi*, *V. salvadorii* etc.) because these animals have zones of mineralization (" hemibacula ") that can be easily identified in males. Several studies report that the ratio of estradiol and androgen in plasma or in amniotic fluid is a possible method to identify turtle's sex. Ultrasound seems to be a very accurate method for the determination of sex in snakes, and hemipenis are evident in males. A study of Department of Veterinary Medical Sciences, University of Parma, has shown that this method has a sensitivity, specificity, and positive and negative predictive value of 100%. X-ray contrast medium and computed tomography can be used in sexing lizards, with good results. Another study of Department of Veterinary Medical Sciences, University of Parma, compared different techniques in sexing lizards, including ultrasonography, radiography with and without contrast medium and computed tomography with and without contrast medium. Results have shown that ultrasound is not the most reliable technique for recognizing hemipenis and the sex of lizard, while X-ray and computed tomography with contrast medium are reliable and accurate techniques in these species. A valid

method and easily achievable for sexing young turtles is cystoscopy. In a recent study cystoscopy, was performed on young turtles. In general, this method has proven to be non-invasive, easily repeatable and rapid.

Dystocia is a common reproductive disease in reptiles. This disease is complex and can have several causes. It can also lead to severe systemic disease. Dystocia in reptiles could be obstructive or non-obstructive. Obstructive dystocia occurs when eggs passage along reproductive tract is prevented. Causes of dystocia can be related to the mother or to the shape and dimension of eggs. In case of non-obstructive dystocia, eggs found are usually normal and anatomy of the mother is physiological. Causes could be behavioural defects, environmental error or pathologies. Treatments are depending on animal species and situation. If dystocia is non-obstructive, you can try to encourage animals to lay eggs creating a suitable place of deposition. Medical treatment involves stimulation of spawning by induction with oxytocin. Oxytocin is administered at the doses of 1/3 IU/kg intramuscularly. A study conducted at the Veterinary University of Parma compared administration of oxytocin intramuscularly and intravenously. This study show that oxytocin administered IV provide faster results than IM dosing for the treatment of non-obstructive egg retention in red-eared sliders. In cases where drug treatment fails or is not practicable or in cases of obstructive dystocia surgical treatment is necessary. As for dystocia, aetiology of follicular stasis is very wide and varied: the causes can be both environmental and pathological. Clinical diagnosis is made primarily by exclusion. As for dystocia, anamnesis is critical to recognize the disease. In reptiles, different organs can prolapse through the cloaca: terminal portion of the gastrointestinal system, urinary bladder, penis or hemipenis in males and oviducts in females. Identification of prolapsed organ is extremely important and must be done before deciding any kind of treatment. In acute and uncomplicated cases, you can manually reduce prolapsed organs. If this is not possible, lubricants and antibiotic ointments could

ensure effective protection. In case you have not been able to act quickly and infection, prolonged venous congestion or necrosis begin, the only solution is amputation surgery.

1. INTRODUZIONE

L'allevamento in cattività dei rettili rappresenta un argomento di particolare interesse sia dal punto di vista medico che sociale. Le motivazioni che lo sottintendono, infatti, sono assai eterogenee e hanno diverse finalità. Pertanto è opportuno procedere con un'analisi critica di tale attività.

Non ci si può esimere dal constatare che soprattutto un allevamento intensivo e indiscriminato per fini essenzialmente "ludici" quale è la terraristica, pone notevoli problematiche etiche. D'altra parte, come puntualizzato in seguito, non si può escludere da tale approccio conservazionistico ed etico anche l'attività di coloro che per presunti motivi di studio e ricerca scientifica, stabulano e allevano rappresentanti dell'erpeto fauna in strutture universitarie o enti affini.

Nella trattazione saranno presi in considerazione i vari aspetti riguardanti la riproduzione dei rettili in cattività che per alcuni casi si accosta a quella dei più comuni mammiferi mentre per altri se ne discosta totalmente. La terminologia utilizzata dovrà tenere conto delle particolarità anatomiche e fisiologiche riferite al mantenimento e allo sviluppo del prodotto del concepimento fino alla nascita dei piccoli. Il termine "gravidanza" definisce una condizione biologica in cui si trova la femmina di un mammifero dal giorno del concepimento al parto. Termini come questo, sebbene tuttora utilizzati dalla letteratura internazionale, per i rettili non sembrano adeguati.

Parleremo quindi di "sviluppo delle uova" e di deposizione delle stesse. Di conseguenza con riferimento alle patologie della riproduzione, utilizzeremo termini come ritenzione o interruzione dello sviluppo piuttosto che distocia o aborto.

Con il termine terraristica (o terrariofilia o vivaristica) si intende in generale l'attività di allevamento o di stabulazione in cattività di esemplari vivi di Anfibi e Rettili. Tale termine, in

questa sede, è inteso a prescindere dalle sue finalità ed è considerato, in senso lato, sinonimo di mantenimento in cattività di Anfibi o Rettili.

Gli esemplari oggetto di allevamento sono di solito mantenuti in appositi contenitori in cui sono (o dovrebbero essere) ricreate le condizioni per la vita e l'espletamento corretto delle funzioni fisiologiche della specie mantenuta. Tali contenitori sono generalmente definiti terrari.

L'allevamento in cattività di Anfibi e Rettili può essere definito come segue:

Amatoriale: inteso come fine a se stesso, spesso mirato alla riproduzione e al mantenimento di un determinato taxon, principalmente per motivi estetici, ludici.

Professionale: allevamento volto alla vendita della prole o dei riproduttori con fini puramente economici.

Con fini scientifici: allevamento non necessariamente finalizzato alla riproduzione il cui fine contempla la possibilità di compiere osservazioni e ricerche scientifiche. Le osservazioni possono essere svolte sull'animale vivente ma anche su preparati istologici o anatomici dello stesso. Questo tipo di allevamento generalmente viene svolto nelle Università o in Enti simili.

Con fini didattici: in questo caso si intende il mantenimento e l'allevamento più o meno temporaneo in cattività di Rettili e Anfibi, sotto la supervisione di un docente responsabile, con lo scopo di rendere immediato e tangibile il contatto e la conoscenza di questi animali in ambito scolastico.

Con fini conservazionistici: si intende il mantenimento e l'allevamento in cattività di Rettili e Anfibi avente come scopo principale la salvaguardia e la conservazione di determinate specie in via di estinzione. Questo scopo è principalmente raggiunto con l'allevamento e la riproduzione ma soprattutto con la reintroduzione in natura di esemplari nati in cattività.

Generalmente questo tipo di allevamento è appannaggio di parchi o giardini zoologici.

Negli ultimi anni, con lo sviluppo delle tecniche di riproduzione di questi animali, il numero di esemplari destinati all'allevamento amatoriale prelevati in natura è in rapida diminuzione. Tuttavia in caso di specie più rare o di difficile allevamento gli esemplari vengono prelevati in natura.

Per questo motivo non si può escludere a priori che la terraristica possa comportare pericoli concreti per la sopravvivenza delle popolazioni naturali, soprattutto nei casi di specie già messe a rischio da altre attività antropiche (deforestazione, inquinamento ecc.). L'impatto conservazionistico della terraristica non può pertanto essere sottaciuto, anche se in molti casi è difficilmente quantificabile.

Fermo restando che rimane essenziale proteggere e favorire la biodiversità, anche qualora non esistano pericoli immediati per le diverse specie, appare comprensibile come l'aspetto etico del mantenimento in cattività esemplari vivi non sia trascurabile: la stabulazione può essere causa di sofferenza e spessissimo di insorgenza di malattie.

Un altro problema strettamente connesso con la terraristica include il rilascio di esemplari precedentemente mantenuti in cattività appartenenti a specie alloctone.

Come è stato ripetutamente sottolineato da diversi autori, tale pratica costituisce un serio e concreto pericolo per le popolazioni autoctone, con rischi di predazione diretta, inquinamento genetico, competizione per le risorse e trasmissione delle malattie.

A titolo indicativo si ricorda che proprio a causa della terraristica (amatoriale e professionale) si deve la presenza allo stato libero, in moltissime località italiane, di numerose tartarughe dalle guance rosse (*Trachemys scripta elegans*), nonché di diverse altre specie in varie parti del mondo. D'altra parte il problema del rilascio di specie alloctone è assai più vasto di quello prospettato e comprende anche casi di rilascio di animali importati a fini alimentari (*Rana catesbeiana*, *R. ridibunda*). Alcuni dati dimostrano comunque che la quota di animali

prelevati nei loro paesi d'origine per la macellazione e la vendita dei prodotti da essa derivata supera di gran lunga la quantità di animali esportati per la vendita ad allevatori professionisti o al pubblico.

Dal punto di vista legislativo i vari decreti che negli ultimi anni sono entrati in vigore sempre con maggior frequenza, hanno lo scopo di salvaguardare la conservazione della fauna nei paesi di provenienza.

Il primo atto concreto fu istituito con la Convenzione di Berna rettificata con la legge n° 503 del 5 agosto 1981, ed ha lo scopo di assicurare la conservazione della flora e della fauna selvatica nei loro rispettivi habitat naturali. I tre punti fondamentali elencati nei tre allegati annessi esprimono l'obbligo da parte di ogni stato di adottare opportune leggi per la salvaguardia delle specie di flora e fauna.

Nel 1996 esce il più rilevante decreto riguardante il commercio delle specie di flora e fauna, il regolamento C.E. 338/97 del Consiglio del 9 dicembre 1996. Nello stesso anno viene inoltre pubblicato, sulla Gazzetta Ufficiale n° 332 del 3 ottobre 1996, l'elenco riguardante le specie animali che possono arrecare pericolo per la salute e l'incolumità pubblica e ne vieta quindi la detenzione (allegato A del decreto ministeriale del 19 aprile 1996).

Nel 2001 viene inoltre perfezionato definitivamente tale decreto con l'istituzione di un registro di detenzione di animali vivi (3 maggio 2001).

2. ANATOMIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE.

CHELONI

I maschi possiedono un unico pene (al contrario di molte altre specie di rettili che hanno due emipeni) localizzato alla base della coda e che non viene coinvolto nella minzione (Fig.1). Il pene durante l'accoppiamento protrude dalla base della cloaca e viene utilizzato solo per veicolare lo sperma all'interno della cloaca della femmina. I testicoli sono due e sono situati all'interno della cavità celomatica in posizione cranioventrale rispetto ai reni. I testicoli possono variare notevolmente sia come forma che come dimensione a seconda del periodo dell'anno. Nei cheloni i dotti deferenti terminano direttamente nell'urodeo al contrario di molti altri rettili in cui sboccano al livello di collo della vescica¹.

La femmina possiede due ovaie in prossimità dei reni adese alla membrana celomatica dorsale (Fig.2), che aumentano notevolmente di dimensioni, occupando gran parte della cavità celomatica, durante lo sviluppo follicolare. Gli ovidotti accolgono l'ovulo e sono responsabili della formazione dell'uovo; nella parte superiore, viene prodotto l'albume e in quella inferiore il guscio grazie alla presenza di numerose. Essi terminano nell'urodeo¹.

SAURI

I reni di questi animali sono metanefritici e si trovano nella parte caudale del celoma o in alcune specie all'interno del canale pelvico. Il segmento posteriore renale è chiamato segmento sessuale, perché contribuisce alla formazione del fluido seminale. Tale porzione, durante la stagione dell'accoppiamento, diventa più voluminosa e cambia drasticamente colore, tanto che può essere confusa con una manifestazione patologica. Spesso è presente una vescica molto sottile, se non è presente, le urine sono immagazzinate nella parte distale

del colon. Gli ureteri, in quest'ultimo caso, terminano direttamente nella parte della cloaca chiamata urodeo.

Le ghiandole renali sono collegate ai testicoli attraverso una struttura simile al mesentere, chiamata *mesorchium*, altre volte invece si trovano a ridosso dei reni².

I testicoli, lisci e ovoidali, sono organi pari, e sono adiacenti o posti caudalmente ai reni, cambiano dimensione in base alla stagione riproduttiva e attraverso il dotto deferente si collegano ciascuno, in modo omolaterale, a uno dei due organi copulatori, chiamati emipeni (Fig.3). Essi sono contenuti in tasche dermiche, alla base della coda, in posizione invertita rispetto a quella che avrebbero se mostrati all'esterno. All'interno di questi organi, si trova il *sulcus spermatico*, che conduce lo sperma all'esterno degli emipeni e in alcune specie di varanidi possiamo distinguere una struttura ossea, chiamata *hemibaculum*, visibile radiograficamente. Durante l'atto riproduttivo, viene utilizzato un solo emipene che si ancora alla cloaca femminile per mezzo di balze dermiche e uncini presenti sulla sua superficie².

La femmina possiede un paio di ovaie e di ovidotti. Le ovaie si trovano nella metà caudale della cavità celomatica. L'ovidotto è circondato da un muscolo liscio, ricoperto da sierosa ed è diviso in 5 regioni: infundibolo, tube uterine, *magnum*, (importante per la produzione dell'albume) utero e vagina. L'ovidotto termina, separatamente o unitamente a quello controlaterale, nell'urodeo della cloaca, tramite una papilla².

OFIDI

I due reni, lobulati e allungati in senso antero-posteriore, sono collocati nella parte dorso-caudale della cavità celomatica. Il rene destro è più craniale rispetto al sinistro; anche in questi animali (così come nei sauri) è presente una parte del rene deputata alla formazione

del liquido seminale. La vescica non è presente e gli ureteri terminano direttamente nell'urodeo. I testicoli fusiformi, che si trovano all'interno del celoma, tra il pancreas e i reni, aumentano di dimensione con la stagione riproduttiva. I maschi possiedono 2 emipeni (Fig.4) che sono estensioni della cloaca e si trovano all'interno di due sacche poste nella porzione ventrale della base della coda in direzione cranio-caudale. In corrispondenza di ogni emipene sono presenti un muscolo retrattore (che collega la punta dell'emipene alle vertebre caudali) e delle ghiandole anali situate ventralmente allo stesso. Ghiandole e muscoli retrattori sono poi circondate dal muscolo propulsore. Durante l'accoppiamento, quando gli emipeni si riempiono di sangue, i muscoli provocano lo sfoderamento dell'emipene che viene poi introdotto nella cloaca della femmina. Lo sperma, durante la copulazione, è contenuto nei dotti di Wolffian, per poi fuoriuscire dagli emipeni, attraverso il *sulcus spermaticus*³.

Le ovaie sono asimmetriche e situate nella parte posteriore del celoma vicino al pancreas. Le gonadi, spesso, sono poste più anteriormente a destra anziché a sinistra e in alcune specie (*Typhlops* e *Leptotyphlops*) manca totalmente l'ovaio e l'ovidotto di sinistra. Le ovaie sono collegate all'ovidotto, che termina nella cloaca tramite una papilla. Esistono specie vivipare e ovovivipare, anche se la maggior parte di esse è ovipara. In altri casi i serpenti si possono riprodurre per partenogenesi³.

COCCODRILLI

Nei cocodrilli i testicoli sono allungati e ricoperti da una spessa tonaca. Sono collegati al bordo di ogni rene, grazie al mesorchio. I dotti deferenti iniziano nella parte posteriore dei testicoli e raggiungono la superficie ventrale della cloaca, vicino alla base del pene, il quale si trova in prossimità dell'apertura cloacale. La superficie dorsale di quest'organo è percorsa da un incavo aperto, utilizzato per lo scorrimento del liquido seminale e formato dalla

fusione di due placche fibrose, che si trovano alla base del pene. Distalmente e lateralmente al punto di fusione delle due placche, si trovano due dotti seminali accessori, il loro fluido contribuisce ad aumentare il volume e a favorire il trasporto del seme. Il pene è composto da: tessuto cartilagineo, tessuto erettile e tessuto cavernoso, quest'ultimo delinea l'incavo e serve a far scorrere il fluido seminale⁴. Durante la copulazione, i corpi cavernosi si rigonfiano, ma il pene non aumenta di molto le proprie dimensioni. La cloaca femminile rimane sigillata durante l'accoppiamento, grazie alla struttura del pene.

Le ovaie sono localizzate antero-medialmente al bordo di ogni rene e sospese dal mesovario. Sono solide, convolute e all'interno troviamo una zona midollare, contenente: tessuto connettivo, vasi sanguigni e linfatici, muscolatura liscia e fibre nervose⁴.

L'ovidotto è composto da tre parti: l'ostio, l'istmo e il segmento uterino. L'ostio è la parte più vicina all'ovario ed è ricca di ghiandole alveolari, di epitelio cubico ciliato e di muscolatura liscia e spessa. L'istmo è, invece, meno ricco di ghiandole e meno muscoloso. Il segmento uterino presenta molte ghiandole, epitelio cubico e muscolatura liscia. L'ovidotto è particolarmente lungo, dal momento che deve contenere un gran numero di uova, e termina nella porzione ventrale della cloaca, anteriormente al clitoride. Il clitoride è simile al pene, ma è di dimensioni più piccole⁴.

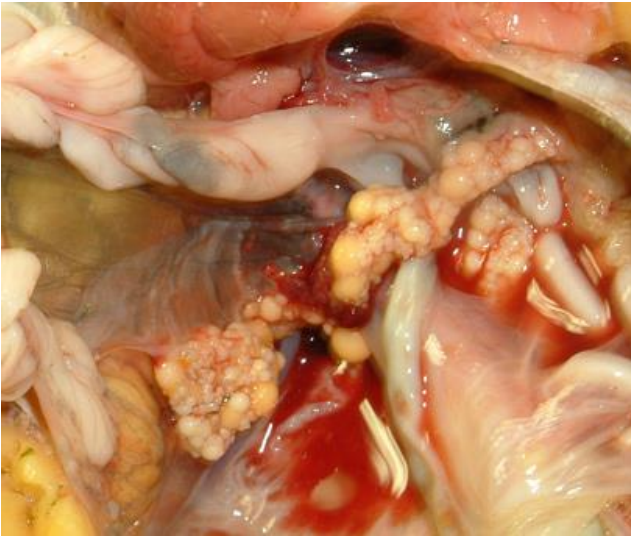


Fig.1: tessuto ovarico quiescente in *Trachemys scripta elegans*.



Fig.2: pene estroflesso in *Testudo hermanni*



Fig.3: localizzazione degli emipeni in *Chamaleo calyptratus*

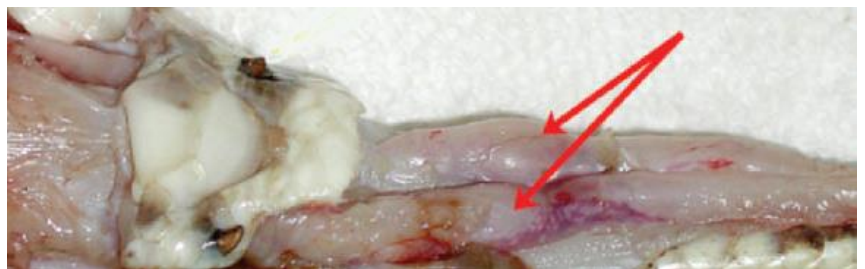


Fig.4: localizzazione degli emipeni in *Python regius*

(Da: Mader D.R. Reptiles medicine and surgery 2005)

3. CENNI DI FISIOLOGIA DELLA RIPRODUZIONE

3.1 Ciclo estrale e ormoni

Il ciclo estrale dei rettili è regolato, come pure nei mammiferi, dagli ormoni steroidei. La variazione di questi ormoni a livello ematico è stata studiata da diversi autori con il risultato di aver dimostrato come la variazione dei dosaggi degli stessi determini l'alternanza delle varie fasi del ciclo riproduttivo. Le ricerche fino ad ora condotte hanno riguardato principalmente i dosaggi del progesterone e del 17-beta-estradiolo. Alcuni studi hanno dimostrato che il profilo del progesterone nei rettili cambia significativamente durante la vitellogenesi e lo sviluppo delle uova⁵. I risultati dei dosaggi ormonali condotti su un ofide viviparo (*Vipera aspis*) hanno messo in luce i livelli basali individuali durante l'anaestrosi stagionale ma non hanno trovato significative variazioni durante lo sviluppo dei feti o durante l'accoppiamento. I risultati nulli di questi studi iniziali probabilmente riflettono il grado individuale di variabilità dei livelli di progesterone plasmatico nei rettili con la concausa di aver utilizzato campioni di piccole dimensioni⁶. Utilizzando un ampio numero di campioni invece si è dimostrato che i livelli di progesterone aumentano notevolmente dopo l'ovulazione raggiungendo picchi di $19,24 \pm 0,79$ ng/ml. Nelle femmine feconde i livelli raggiungono la concentrazione di $4,06 \pm 2,17$ ng/ml e permangono tali durante tutto il periodo dello sviluppo delle uova o dei feti. Nei rettili vivipari e ovovivipari i livelli di progesterone cadono al momento della deposizione raggiungendo i livelli basali stimati in $1,72 \pm 0,79$ ng/ml. La relazione tra presenza di uova (anche placentari) ed alti livelli di progesterone suggerisce che questo ormone gioca un ruolo importante nella riproduzione delle specie ovipare per esempio stimolando la vascolarizzazione degli ovidotti durante i tre mesi in cui si ha lo sviluppo delle uova. Alcuni studi condotti su rettili vivipari hanno dimostrato un calo del livello di progesterone nel plasma strettamente legato alla

deposizione. Sembra che, come accade nei mammiferi, siano i feti a determinare il momento ottimale per la loro nascita⁷.

Il 17-beta estradiolo è stato descritto come un ormone vitellogénico grazie alla sua capacità di promuovere lo sviluppo dei follicoli e la formazione di strati protettivi dell'uovo. Il livello basale nella femmina è di $32,80 \pm 12,91$ pg/ml. L'aumento del livello di estradiolo osservato esclusivamente nelle femmine in fase vitellogénica è direttamente responsabile della mobilitazione delle riserve materne in questa fase del ciclo. La concentrazione dell'estrogeno quando i follicoli sono in fase preovulatoria, comincia a salire e raggiunge un picco di $1306,00 \pm 407,01$ pg/ml. In questa fase il progesterone resta molto basso. La concentrazione del 17-beta estradiolo scende leggermente subito dopo l'ovulazione mantenendosi sui $285,60 \pm 143,00$ pg/ml. Va sottolineato come il progesterone sia in effetti un antagonista dell'estradiolo, riducendo la vitellogenési e intensificando gli scambi materno fetali a livello di ovidutto. Il rapido incremento dei livelli di progesterone alla fine della vitellogenési è certamente coerente con queste ipotesi. In alcuni esperimenti si è dimostrato come gli effetti degli impianti di estradiolo non sono svaniti dopo la loro rimozione ma bensì dopo la fine della vitellogenési. Queste osservazioni suggeriscono che, in circostanze normali, alcuni meccanismi inibitori concludono la vitellogenési al momento appropriato⁸. Il progesterone sembra essere il diretto responsabile di questo processo di feedback negativo. Una ulteriore conferma della correlazione negativa tra progesterone e 17-beta estradiolo è stata dimostrata valutando i dosaggi ormonali in animali in riposo stagionale. In questi esemplari in fase anaestrale si è rilevato un picco del livello di progesterone simile a quello rilevato in fase post-deposizione. Questo rialzo repentino inibirebbe la vitellogenési essendo i suddetti animali in fasi fisiologiche molto stressanti. Il livello basale di progesterone nelle femmine in riposo sessuale risulta simile a quello dei maschi. I corpi lutei sono la maggior

risorsa di progesterone in presenza di uova, ma le surrenali sono la maggior risorsa di questo steroide in femmine di serpenti non gravide o nei maschi⁷. Le prostaglandine (PG) costituiscono un gruppo di molecole di origine lipidica biologicamente attive, sintetizzate sotto varie forme chimiche. Queste sostanze fanno parte degli ormoni ad azione locale. Sono sostanze fisiologicamente presenti nell'organismo dotate di molteplici azioni biologiche, soprattutto di mediazione locale della risposta delle cellule a differenti stimoli. Le prostaglandine derivano dall'acido arachidonico, un acido grasso polinsaturo che costituisce insieme ad altre sostanze la componente fosfolipidica delle membrane cellulari. Sono noti numerosi gruppi di prostaglandine ed è risaputo che pesci, anfibi, rettili e mammiferi sintetizzano una o più prostaglandine partendo da acidi grassi precursori. Recentemente è stato dimostrato che, nel sauro viviparo *Sceloporus jarrovi*, le prostaglandine sono prodotte anche da ovaie, ovidutti, testicoli, epididimo e fegato⁹. Fra i principali eventi fisiologici influenzati dalle prostaglandine vanno annoverati: aggregazione piastrinica, mantenimento del bilancio elettrolitico ed effetti protettivi nei riguardi delle mucose. Molto importante è l'azione delle prostaglandine sul meccanismo dell'infiammazione. Queste sostanze infatti determinano l'ampiezza e la durata della reazione infiammatoria con la loro azione di regolazione locale dell'irrorazione sanguigna, di controllo della permeabilità vasale e di regolazione della chemiotassi macrofagica e leucocitaria. Numerosi studi hanno dimostrato, inoltre, che le prostaglandine sortiscono importanti effetti anche sull'apparato genitale di rettili e volatili¹⁰. Queste sostanze anche nei rettili agiscono sulla mucosa dell'utero aumentandone le contrazioni e sui corpi lutei determinandone la lisi. L'inoculazione di prostaglandine in lucertole ovipare durante la tarda fase dello sviluppo delle uova induce la deposizione entro 2 ore. Al contrario, la somministrazione di PGF₂α a metà sviluppo non sortisce alcun effetto¹¹. Per avvalorare questa ipotesi sono state somministrate PGF₂α ed

acido arachidonico a quattro specie di lucertole ovipare con presenza di uova. Si è verificato un cambiamento di comportamento negli animali che hanno assunto atteggiamenti tipici della deposizione nonostante questa non sia avvenuta. Gli ovidutti sono stati rimossi, posti in organocultura e trattati con 30-100 ng di PGF2 α /ml di mezzo di coltura. Gli organi hanno risposto con una deposizione in vitro. Anche l'acido arachidonico si è dimostrato efficace nell'indurre contrazioni nelle due tube uterine. Da ciò si può dedurre che le prostaglandine sarebbero in grado di indurre l'ovideposizione, ma l'innervazione dell'ovidutto può comunque inibire il loro effetto qualora vengano somministrate poco prima della naturale deposizione. È stata osservata perciò una similitudine tra rettili e mammiferi: in entrambe i casi le contrazioni uterine sottostanno ad un controllo di tipo nervoso centrale. La somministrazione in vivo di dicloroisoprotenolo (antagonista dei β -adrenocettori) in ragione di 2 μ g/kg, a gechi vivipari in fase terminale dello sviluppo del prodotto del concepimento, ha fatto aumentare notevolmente l'effetto delle prostaglandine sulle tube favorendo l'induzione del parto¹². È stato inoltre dimostrato come anche nei rettili le prostaglandine vadano ad agire sulla funzionalità e sulla morfologia del corpo luteo. Alcune lucertole gravide di *Anolis carolinensis* sono state inoculate con un'iniezione contenente 0.1 μ g di PGF2 α e 0.05ml di soluzione salina. I soggetti sono stati sacrificati 24 ore dopo la somministrazione ed è stata evidenziata luteolisi con diminuzione dei livelli plasmatici di progesterone¹¹. Sono stati anche valutati gli effetti delle prostaglandine a livello di corpo luteo riferiti alla secrezione di progesterone e 17- β -estradiolo in lucertole della specie *Podacris sicula sicula*¹³. La secrezione delle PGF2 α è risultata maggiore quando dosata su animali che avrebbero presumibilmente deposto entro 48 ore e più bassa su animali con uova a livello di ovidutto (fase considerata intermedia se riferita alla gravidanza). Per dimostrare che le prostaglandine fungono anche da mediatori dei comportamenti sessuali sono stati iniettati 15 μ g di PGF2 α

in femmine ovariectomizzate, perciò non sessualmente recettive: non è stato evidenziato alcun effetto. L'inoculazione della stessa dose su femmine pretrattate con estrogeni (quindi sessualmente recettive) ha inibito la recettività sessuale un'ora dopo il trattamento. È stato inoltre appurato che la dose minima efficace è di 1.5 µg. Anche le prostaglandine E2 ed E1 alla dose di 15 µg sono risultate efficaci nell'inibizione della recettività sessuale in rettili ovipari e ovovivipari. Durante gli studi condotti è stato osservato che l'efficacia delle prostaglandine è quasi immediata, che comincia a diminuire dopo circa 3 ore dalla somministrazione e che scompare completamente dopo 6 ore dal trattamento¹¹.

3.2 Strategie riproduttive

La maturità sessuale dei rettili, dipende principalmente dalla taglia piuttosto che dall'età effettiva dell'animale. In cattività, l'alimentazione e le cure dell'allevatore, possono giocare un ruolo fondamentale nel raggiungimento della taglia necessaria all'animale per maturare sessualmente. Spesso, un animale d'allevamento raggiunge prima la maturità sessuale rispetto ai suoi simili in natura.

Tuttavia, gli animali più longevi tendono ad avere una maturazione sessuale più tardiva, accoppiamenti meno frequenti, ed effettuare meno ovo deposizioni¹⁴.

Nell'ambiente naturale, la maturazione sessuale può essere molto variabile nella stessa specie; ad esempio, le femmine di *Sceloporus jarrovi* raggiungono per il 60% la maturità a 5 mesi, mentre le restanti femmine la raggiungono entro i 17 mesi. Gli individui di *Scincella lateralis*, nati durante i mesi estivi, impiegano meno di un anno a maturare, mentre quelli nati nel periodo successivo, possono impiegare fino a 20 mesi. La maggior parte delle femmine di *Cnemidophorus tigris* e *Gambelia wislizeni* raggiungono la maturità in 27 mesi, ma altre la raggiungono prima, circa a 9 mesi.

I rettili possono usare diverse strategie riproduttive, che possono variare, da specie a specie, in base al clima e alle risorse alimentari. I rettili possono essere ovipari, ovovivipari, vivipari o riprodursi per partenogenesi.

La maggior parte dei rettili sono **ovipari**, ovvero depongono uova con guscio sulla sabbia o in nidi creati appositamente¹⁴. In questi animali, distinguiamo due fasi del ciclo riproduttivo, la prima è chiamata “previtellogenesi”, nella quale i follicoli maturano nell’ovario, la seconda “vitellogenesi”. In questa seconda fase, molto importante, gli estrogeni inducono il fegato a trasformare i lipidi in vitellogenina, la quale viene riversata nel circolo sanguigno e successivamente assorbita dai follicoli, che diventano da 10 a 100 volte più grandi e da bianchi si colorano di giallo. Il fegato, impegnato in questa attività, aumenta notevolmente di dimensioni e assume un colore giallastro. Un ruolo molto importante è svolto dalle riserve di calcio, che solitamente troviamo a livelli molto elevati nel plasma durante questa fase. Dopo l’ovulazione, i nutrienti sono trasferiti dalla madre all’ovulo, che diventa un vero e proprio uovo, dopo l’aggiunta dell’albumina e del guscio. Grazie all’ecografia, è possibile monitorare tutte le fasi di sviluppo dell’uovo e spesso anche prevedere l’ovo deposizione. La consistenza del guscio dipende dalla specie: è flessibile nella maggior parte delle lucertole, nei serpenti e anche in qualche tartaruga, mentre è rigida nelle uova di coccodrillo, tartaruga e numerosi gechi.

La condizione di **ovoviviparità** è riscontrabile in alcuni rettili. Le uova, in questo caso, vengono ritenute all’interno del corpo, fino alla nascita della prole. Questa può essere considerata una strategia evolutiva di alcuni animali, che in condizioni climatiche favorevoli effettuano l’ovo deposizione, ma se il clima non lo permette, ritengono le uova fino alla nascita della prole¹⁵. Un esempio di animale ovoviviparo, è il serpente *Typhlops Bibronii*, il guscio delle sue uova ritenute si presenta soffice e sottile. Invece, gli individui del genere

Lacerta spp. e *Gerrhonotus spp.* possono essere alternativamente ovipari o se le condizioni non lo consentono ovovivipari.

Alcuni serpenti e lucertole sono **vivipari**, ciò significa che l'embrione si sviluppa all'interno del corpo dell'animale e che è presente una placenta. I piccoli fuoriescono dal corpo dell'animale vivi e reattivi. Gli scinchi del genere *Mabuya spp.* presentano una placenta corion allantoidea, mentre nel sud della California, *Xantusia Viglis* e diverse altre specie di lucertole, presentano una placenta discoidale, simile a quella dei roditori e dei primati. La femmina inoltre, una volta espulso il feto, consuma i residui di placenta¹⁶.

Un aspetto negativo della viviparità è che il feto limita le funzioni gastrointestinali della madre, la quale, nell'ultimo periodo della gravidanza, si nutre con minore frequenza o addirittura cessa di alimentarsi. Alla nascita della prole la madre si trova in condizioni precarie e, dal momento che le sue riserve di lipidi scarseggiano, è in grado di riprodursi dopo molto tempo. In genere l'accoppiamento può avvenire solo una volta ogni due anni¹⁷.

Questo accade difficilmente in cattività, perché una buona nutrizione post-partum, fornita dall'allevatore, permette al rettile di riprodursi annualmente.

Anche nel caso degli ovipari, abbiamo una diminuzione della nutrizione durante l'ultima fase di gravidanza, ma in questo caso il periodo è più breve e gli effetti sono meno evidenti.

La **partenogenesi** è una modalità di riproduzione asessuata, in cui si ha lo sviluppo dell'uovo senza che sia avvenuta la fecondazione. Trenta specie di lucertole e alcuni serpenti possono riprodursi con questo metodo. *Cnemidophorus uniparens*, *C. velox* e *C. tesselatus* alternano la partenogenesi a una riproduzione sessuata, a seconda della disponibilità del maschio¹⁸. La partenogenesi può essere: telitoca, (la discendenza è solo di sesso femminile) arrenotoca (sono presenti solo individui maschi) deuterotoca, (la discendenza è composta sia da individui maschi sia da femmine)¹⁹.

Dal momento che solo limitate risorse energetiche possono essere dedicate alla riproduzione nei rettili solitamente si ha un compromesso tra il numero di uova e la dimensione dei piccoli. Poca energia può essere dedicata a numerosi piccoli o molta energia può essere distribuita tra pochi piccoli¹⁴. Il numero di uova prodotte da un rettile può essere estremamente variabile e può andare da un solo uovo (*Anolis carolinensis*, *Malocochersus tornieri*) fino a più di 200 uova (*Chelonia mydas*). Nelle specie vivipare possiamo avere un solo piccolo per gestazione (*Trachysaurus rugosus*) oppure anche più di 90 piccoli (*Thamnophis radix*)²⁰.

Diverse tecniche sperimentali sono state messe a punto per alterare il numero di nati. Per esempio eliminando alcuni follicoli durante la fase di vitellogenesi, si riduce il numero di nati aumentandone notevolmente le dimensioni e la vitalità alla nascita. Sebbene questa tecnica non sia molto utile dal punto di vista clinico può essere comunque utilizzata in alcune specie di boa e in numerosi sauri, in cui le dimensioni dei neonati sono particolarmente ridotte, per aumentare la percentuale di sopravvivenza dei piccoli.

In alternativa un trattamento con FSH durante le prime fasi del ciclo riproduttivo consentono di aumentare il numero di nati che però avranno dimensioni ridotte²¹.

Sebbene molti rettili possano riprodursi durante tutto l'anno, la maggior parte di questi animali ha delle ben precise stagioni riproduttive. In genere tali periodi sono legati a ben precisi stimoli ambientali (il più frequente è il cambio di temperatura) in grado di avviare il ciclo riproduttivo.

Anche se le condizioni ambientali sono corrette inoltre vi sono molti altri fattori in grado di influenzare il ciclo riproduttivo di questi animali. In alcune specie per esempio (*Iguana iguana*) le femmine sono in grado di procedere con l'intero ciclo ovarico anche in assenza del maschio mentre per alcune specie di serpenti le femmine richiedono la presenza del

maschio (e possibilmente l'atto dell'accoppiamento) per il passaggio dalla fase previtellogenica a quella vitellogenica¹⁴.

In aggiunta nei rettili l'attività riproduttiva può essere inibita da carenza di fonti energetiche e, se le femmine non hanno sufficiente scorta lipidica, possono saltare la stagione riproduttiva rimanendo quiescenti. La frequenza con cui un rettile si riproduce quindi dipende dalla specie, dalle condizioni ambientali e dallo stato di nutrizione della femmina. Molte specie ovipare sono in grado di effettuare più deposizioni all'anno (soprattutto cheloni e sauri) e alcune specie di gechi tropicali sono in grado di deporre 2 uova al mese per tutto l'anno. Solitamente tra una deposizione e l'altra non serve un ulteriore accoppiamento in quanto molte femmine sono in grado di immagazzinare lo sperma del maschio e di utilizzarlo per lunghi periodi¹⁴.

Nelle specie vivipare, invece, la gestazione è generalmente molto lunga e può variare da 1,5 a 6 mesi. Durante tutto questo tempo le femmine tendono a non alimentarsi pertanto questi animali saranno in grado di riprodursi una sola volta all'anno¹⁴.

La maggior parte dei rettili non mostra alcuna cura materna per le uova o per i piccoli che vengono abbandonati al momento della nascita.

Esistono tuttavia eccezioni a questa regola generale infatti alcune specie di pitoni covano le uova fino al momento della schiusa proteggendole dai predatori e garantendo la giusta temperatura e umidità²². Comportamenti di guardia al nido sono poi stati documentati in numerosi rettili, sia cheloni (*Manouria emys*) che sauri (*Eumeces* spp., *Mabuya* spp.) che ofidi (*Ophiophagus hannah*, *Naja* spp.) ma soprattutto nei coccodrilli. I coccodrilli non solo fanno la guardia al nido ma assistono i piccoli nei primi momenti della loro vita.

Anche alcune specie vivipare mettono in atto rudimentali cure parentali, i serpenti a sonagli per esempio rimangono coi piccoli fino alla prima muta (per circa 1 settimana)²³.

Altre specie aiutano i piccoli a fuoriuscire dal sacco amniotico (*Mabuya* spp., *Xantusia* spp.) o ingeriscono i sacchi vitellini non fertili diminuendo le probabilità di attirare predatori (*Boa constrictor*, *Eryx* spp.)¹⁴.

3.3 Abitudini di accoppiamento e fertilizzazione.

Nella maggior parte delle tartarughe, la riproduzione è legata alla stagione. Condizioni favorevoli, possono essere la stagione primaverile nelle zone temperate o la stagione umida nelle aree tropicali. In cattività, per riprodurre queste condizioni, è necessario fornire, dopo un periodo di ibernazione, un aumento del fotoperiodo e della temperatura. Per le tartarughe che non vanno in letargo, occorre modulare temperatura e fotoperiodo in modo che rispecchino il più possibile le condizioni naturali. Nel caso di individui allevati insieme, si consiglia di separare i maschi dalle femmine per alcuni giorni o settimane e poi rimetterli insieme²⁴.

L'atteggiamento del maschio durante il corteggiamento è di notevole aggressività, sia nei confronti degli altri maschi, con i quali combatte copiosamente, colpendoli con la corazza e cercando di rovesciare sul dorso l'avversario, sia nei confronti della femmina. Infatti prima della copulazione, il maschio insegue la femmina, la sperona, la morde alla testa e alle zampe e infine la immobilizza contro un ostacolo. Durante la fase di accoppiamento vero e proprio, il maschio si pone sopra la femmina e la feconda estroflettendo il pene, introducendolo nella cloaca e facendo scivolare il proprio sperma all'interno (Fig.5). Numerose vocalizzazioni e rantoli da parte del maschio vengono emessi sia durante l'atto sessuale, sia nella fase precedente.

Da quattro a otto settimane dopo, generalmente avviene l'ovo deposizione¹⁴.

Il comportamento durante la gravidanza è facilmente riconoscibile. La femmina tende ad essere molto agitata, è aggressiva nei confronti delle altre femmine e inizia a scavare buche due settimane prima della deposizione. In molti casi è possibile percepire le uova tramite palpazione a livello di fosse prefemorali ma è sempre consigliabile effettuare una radiografia per una diagnosi certa di gravidanza. La femmina gravida costruisce il nido in diverse ore. Scava, con gli arti anteriori, buche nel terreno e vi depone le uova, ricoprendole di terriccio e foglie con gli arti posteriori. E' molto importante, che il nido sia adatto per umidità e temperatura alla maturazione delle uova e che sia totalmente invisibile ad eventuali predatori. A volte, le tartarughe possono trattenere le uova, arrestando lo sviluppo embrionale della prole per anni quando non trovano le condizioni adatte a nidificare. Lo sperma, inoltre, può essere immagazzinato nell'ovidotto fino a sei anni, quindi la deposizione di uova fertilizzate può verificarsi senza che sia avvenuto l'accoppiamento durante quel ciclo riproduttivo²⁵. Talvolta, alcune tartarughe possono depositare uova non fertilizzate, esse sono spesso abbandonate dalla madre sul terreno.

I comportamenti riproduttivi di tutte le specie di lucertole dipendono principalmente dalla variazione stagionale, correlata al cambiamento di temperatura e del fotoperiodo. Per questo, se si vuole far riprodurre questi animali in cattività, è necessario valutare per ogni specie una temperatura e un'illuminazione adeguata. Il comportamento sessuale è correlato alla fisiologia dell'animale ed è accompagnato dall'azione di diversi ormoni riproduttivi, che coordinano il comportamento.

Nei maschi, durante la stagione riproduttiva, si ha una recrudescenza dell'attività testicolare, con un aumento della concentrazione di androgeni nel plasma^{26,27}.

Anche la recettività della femmina sembra essere correlata a un cambiamento nella secrezione di steroidi sessuali. Quando nella femmina di lucertola il follicolo diventa maturo,

aumenta anche la concentrazione di estradiolo 17 B e progesterone²⁸. Nella specie *Anolis carolinensis*, la recettività inizia nell'ultima metà della follicogenesi, ovvero quando i follicoli maturi sono presenti nell'ovario e termina sette giorni più tardi, quando avviene l'ovulazione. La femmina di questa specie manifesta l'atteggiamento recettivo, inclinando il capo e favorendo la presa, da parte del maschio^{10,29,30}.

Durante il periodo riproduttivo, un atteggiamento caratteristico di diverse specie di lucertole è quello di riprodurre particolari danze e movimenti ritmici della testa. In alcune specie, possiamo notare il gesto di estendere e retrarre il gozzo per mettere in evidenza la sua brillante colorazione e richiamare l'attenzione della femmina. L'aggressività dei maschi, durante la stagione dell'accoppiamento, è molto evidente, in alcuni casi però, anche le femmine tendono ad essere aggressive nei confronti delle altre femmine, specialmente durante l'ovo deposizione.

Molte lucertole sono in grado di cambiare i colori della propria pelle in base al periodo riproduttivo, ne è un esempio *Crotaphytus collaris*. La femmina di questa specie ha delle macchie laterali, che diventano arancione brillante, nelle 12 ore precedenti alla vitellogenesi, con un massima intensità soprattutto durante l'ovulazione e circa 10 giorni prima dell'ovo deposizione. Queste macchie sbiadiscono nei giorni seguenti alla deposizione delle uova³¹.

Molti camaleonti, soprattutto maschi, sono in grado di cambiare il loro colore della pelle, durante il corteggiamento; mentre le femmine cambiano colore quando sono gravide.

Diversi tipi di lucertole possiedono ghiandole epidermiche, sulla faccia ventrale o precloacale delle cosce, che producono secrezioni olocrine e la cui attività sembra essere legata a quella dei testicoli. Si è notato infatti che nei maschi castrati, le ghiandole epidermiche tendono ad andare in atrofia e nel *Gekko gecko* compaiono in seguito a iniezioni di testosterone³².

Queste ghiandole sono sotto il controllo ormonale e la loro secrezione contiene cheratina,

proteine, lipidi e componenti volatili³³. Nell'iguana del deserto (*Dipsosaurus dorsalis*), queste secrezioni assorbono i raggi ultravioletti tra 350 e 400 nm, causando una fluorescenza, che sembra essere riconosciuta visivamente dai consimili³⁴.

Un comportamento che sembra presupporre la presenza di feromoni è stato notato nel gecko leopardino (*Eublepharis macularium*), che lecca i suoi conspecifici, durante il periodo riproduttivo. Nella pelle di questi animali, sono state trovate diverse sostanze analoghe al colesterolo, uniche per i maschi, mentre nella pelle delle femmine sono stati rinvenuti metilchetoni a lunga catena, non presenti nel maschio³⁵.

Si pensa che anche lo strofinamento della gola e della cloaca, che avvengono in numerose specie, siano in un qualche modo correlate all'emissione di feromoni.

La monogamia non è tipica di tutte le lucertole, ma è presente nella specie *Thrachydosaurus rugosus*. Questi individui rimangono fedeli al compagno, per diverse stagioni riproduttive³⁶.

La fertilizzazione è interna e durante la copulazione, gli spermatozoi sono depositati nella porzione anteriore della cloaca femminile, si spostano successivamente verso l'alto, dirigendosi nell'ovidotto, in circa 24-48 ore; qui, fertilizzano le uova che sono rilasciate nell'ovidotto dall'ovario³⁷. Alcune lucertole hanno vescicole o tasche dermiche, che permettono agli spermatozoi di sopravvivere a lungo, anche dopo il passaggio delle uova, in modo che la fertilizzazione avvenga anche al ciclo riproduttivo successivo^{38,39,40,41}.

Solitamente entrambi gli ovari producono simultaneamente le uova, eccetto nelle specie *Anolis aeneus* e *Anolis carolinensis* che producono uova alternativamente^{42,43}.

La costruzione del nido, in natura, dipende molto dalla specie e dall'ambiente. Nidi, contenenti uova di lucertola, possono trovarsi nelle tane abbandonate dei roditori, nelle cavità degli alberi e anche all'interno di abitazioni umane in zone che permettano di nascondere dai predatori le uova.

Le uova dei sauri presentano un guscio flessibile e sono costituite da una membrana fibrosa, con cristalli di calcio carbonato tra le fibre o depositati sulla superficie.

Nei gechi, le uova prodotte hanno un guscio rigido, calcareo contenenti cristalli di calcite⁴⁴.

Negli ofidi il corteggiamento è molto importante e i comportamenti durante questa fase possono essere diversi da specie a specie. Molti serpenti maschi del genere *Crotalus* competono tra loro effettuando un'elaborata danza e un falso combattimento. I feromoni specie specifici giocano un ruolo fondamentale nell'attrazione del partner, in particolar modo in colubridi e crotalidi. La femmina di queste specie emette una traccia odorifera, percepita e seguita dal maschio.

Prima dell'accoppiamento, inoltre, il maschio si avvicina alla femmina e con la sua lingua bifida o con il mento, ne percorre tutto il corpo per captare i feromoni. Dopo tale comportamento, avviene la copulazione vera e propria con la apposizione delle cloache; gli emipeni vengono utilizzati alternativamente e volontariamente dal maschio (Fig.6).

Gli accoppiamenti, in questi animali, sono spesso serali o notturni e gli animali possono rimanere fermi e uniti per diversi minuti o ore²⁵. Nello stesso ciclo riproduttivo si verificano vari accoppiamenti, per esempio nel *Boa constrictor* l'accoppiamento dura 1-2 giorni e i due boa si distaccano per riunirsi dopo poco tempo, per circa 3-6 volte, dopo tale comportamento la femmina assumerà una colorazione più scura e il maschio non proverà più attrazione sessuale per essa.

Durante l'ovulazione, il serpente aumenterà di volume nella sua metà posteriore e contrazioni muscolari favoriranno lo spostamento delle uova negli ovidotti. In generale, se l'animale è oviparo, avverrà una muta precedente alla ovo deposizione, che avviene prevalentemente di notte.

Il numero di uova deposte dipende da specie a specie, per esempio il *Python regius* depone da 1 a 11 uova, che cova per 2 mesi, durante i quali contrae ritmicamente i muscoli, in modo da garantire condizioni termiche favorevoli allo sviluppo delle uova deposte. Le uova dei serpenti sono di varie dimensioni, sono teleocitiche e il guscio è di consistenza variabile; possono essere ovali, bianche o giallastre, lisce o solcate e deposte singolarmente o agglutinate in grappoli.

Negli ofidi vivipari la gravidanza affatica molto la femmina, che tende a stazionare al caldo, a non attorcigliarsi e ad essere meno attiva. Nel *Boa constrictor* il parto avviene nelle ore notturne e può impiegare da dieci minuti a sei ore²⁵.

Il corteggiamento dei coccodrilli maschi è accompagnato da diverse vocalizzazioni, principalmente sibili e gorgogli attraverso la superficie dell'acqua. Altre manifestazioni che servono ad attirare l'attenzione della femmina possono prevedere l'estensione e la chiusura ritmica delle narici e la percussione delle mandibole.

Una volta che la femmina recettiva si avvicina al maschio, esso l'afferra con i suoi arti e si posiziona sopra il suo dorso portando la cloaca a contatto con quella della femmina. L'inseminazione avviene tramite il fluido seminale che passa dal pene alla cloaca femminile. Dopo circa un mese, la femmina cerca un nascondiglio adatto per depositare le uova²⁵.

Il nido, solitamente, viene costruito sulla sabbia o sul terreno, vicino a una fonte d'acqua. La femmina scava un buco profondo e deposita le uova di notte, ricoprendole di suolo argilloso o sabbia per nasconderle da eventuali predatori. All'interno la temperatura del nido è di circa 32°, anche se esiste un gradiente di concentrazione dal centro alla periferia. Nei tre mesi successivi la femmina torna ogni notte a controllare il nido fino a che le vocalizzazioni dei piccoli richiamano la sua attenzione e la inducono a scavare per liberare le sue uova dall'ingombro del terreno. Occasionalmente anche il maschio partecipa a questa operazione.

Sembra, inoltre, che i batteri del suolo, producendo acido carbonico e altre sostanze litiche organiche, inducano la degradazione del guscio delle uova aiutando i piccoli coccodrilli ad uscirne. Una volta liberati dall'ingombro delle uova i coccodrilli si avvicineranno immediatamente all'acqua e saranno subito in grado di procacciarsi il cibo autonomamente²⁵.

3.4 Inseminazione

Gli spermatozoi dei rettili sono morfologicamente simili a quelli di forme superiori di invertebrati (Fig.7). La fecondazione delle uova, da parte di spermatozoi immagazzinati nel tratto riproduttivo femminile, è solitamente possibile anche dopo mesi o perfino anni dall'accoppiamento. La ritenzione dei gameti maschili vitali è detta *amphigonia retardata* e si ritiene che questa caratteristica offra molti benefici per la sopravvivenza delle specie essendo un adattamento molto utile alle condizioni ambientali quando c'è una relativa scarsità di maschi conspecifici disponibili ^{25,45-47}.

Essa permette inoltre la colonizzazione di habitat da parte di femmine solitarie precedentemente fecondate e diminuisce i rischi dovuti all'esposizione ai predatori durante accoppiamenti frequenti.

Gli spermatozoi immagazzinati possono o meno perdere le loro code durante il prolungato deposito.

In alcune specie di rettili, l'ultima parte dell'ovidutto, detta anche "porzione uterina" è modificata con la formazione di pliche mucosali, dette cripte. Tali cripte contengono generalmente ghiandole submucosali in grado di secernere sostanze che forniscono protezione e nutrimento agli spermatozoi trattenuti.

Il modo in cui lo sperma raggiunge l'ovulo maturo entrando nell'infundibolo dell'ovidutto è ancora oggi oggetto di studio ma pare che, in certi casi, gli spermatozoi siano trasportati dall'azione delle stereociglia delle cellule a colonna dell'epitelio della mucosa.

In altri casi la porzione terminale dell'ovidutto manca di ciglia e quindi è stato suggerito da alcuni ricercatori che le uova ancora senza guscio durante la discesa preleverebbero gli spermatozoi direttamente dalla loro posizione di riposo dentro le cripte. Questa teoria è ancora oggi in discussione⁴⁸.

3.5 Monitoraggio dello sviluppo delle uova e incubazione artificiale

Nell'allevamento dei rettili in cattività un accurato monitoraggio dei riproduttori presenta una duplice importanza. Permette di sopperire ad eventuali errori di management nel caso di mancata fertilizzazione e inoltre permette di capire quale sia il grado di sviluppo del prodotto del concepimento e quindi di stabilire quale sia il giorno previsto per la deposizione. Le moderne tecniche di monitoraggio e l'esperienza acquisita in questi ultimi anni permettono inoltre di valutare in modo preciso lo sviluppo follicolare e quindi di stabilire quale sia il periodo migliore per l'accoppiamento.

La presenza di uova in femmine di ofidi, sauri, cheloni e coccodrillo può essere sospettata grazie al graduale aumento del peso e delle dimensioni dell'animale. In alcuni cheloni la presenza di uova può essere apprezzata tramite la palpazione della porzione caudale della cavità celomatica attraverso le fosse prefemorali. L'animale deve essere delicatamente ruotato da parte a parte e se presenti possono venire apprezzate al tatto⁴⁹. Nella maggior parte dei sauri la deposizione è preceduta da un drastico dimagrimento dovuto al consumo delle riserve utilizzate per la vitellogenesi²⁵.

L'ultrasonografia è un altro metodo tramite il quale può essere diagnosticata la presenza di uova o di embrioni in femmine di rettili, consente inoltre di monitorare sia il corretto sviluppo del prodotto del concepimento e l'eventuale sviluppo dei follicoli ovarici e programmare gli accoppiamenti⁵⁰ (Fig.8).

In alternativa può essere impiegato l'uso della radiografia che permette di determinare con certezza assoluta la presenza di gusci calcificati, il loro numero, la loro posizione ed il grado di mineralizzazione. Numerosi studi inoltre hanno dimostrato che le radiazioni non influiscono sull'attività riproduttiva delle femmine con presenza di uova grazie alla minor sensibilità dei rettili alle radiazioni ionizzanti rispetto ai mammiferi più evoluti^{51,52}.

Per un corretto monitoraggio del prodotto del concepimento sarebbe opportuno utilizzare entrambe le metodiche sopra descritte in quanto la radiografia permette di essere applicata anche ad animali molto piccoli, di stabilire l'esatta posizione delle uova ed eventuali aderenze tra i gusci, di stabilire il numero delle uova e anche il grado di calcificazione mentre l'ultrasonografia permette di monitorare le uova durante tutto il loro sviluppo e consente di individuare le vescicole embrionali quando queste non presentano ancora calcificazione. In animali vivipari inoltre può essere utile per valutare la vitalità dei feti.

Le uova dopo la deposizione devono essere rimosse dal terrario per venire incubate artificialmente dall'allevatore. Questa pratica ha diverse funzioni: altre femmine possono scegliere lo stesso sito di nidificazione e danneggiare la covata, alcune uova possono disidratarsi, alcune specie di rettili possono nutrirsi delle uova di consimili, i piccoli possono venire danneggiati o mangiati una volta usciti dal loro involucro, l'ambiente incubatoio può essere controllato molto più facilmente rispetto ad un terrario. La maggior parte delle uova di ofidi e sauri sono elastiche e coriacee al momento della deposizione, al contrario i cheloni depongono uova generalmente più dure. In molte specie di ofidi e sauri inoltre le uova

tendono ad aderire le une alle altre dopo la deposizione e in questi casi si raccomanda di non cercare di separarle correndo il rischio di lacerare il guscio ancora molle.

Un incubatrice artigianale può essere facilmente costruita utilizzando una scatola di polistirolo con acqua sul fondo. All'interno verrà applicata una rete plastificata sui cui si appoggeranno delle vaschette contenenti il substrato scelto per alloggiare le uova. Verrà poi introdotta una resistenza elettrica collegata ad un termostato per mantenere costante la temperatura all'interno del sistema ed un igrometro per il monitoraggio dell'umidità. Il substrato idoneo ad accogliere le uova per essere incubate deve essere pulito, non resinoso, non tossico e capace di assorbire una certa umidità.

La maggior parte degli allevatori impiega come mezzo di incubazione un medium fine, sabbia di lido pulita e senza sale, sfango di acquitrino, torba di palude o foglie di quercia ben decomposte. Generalmente un leggero ambiente acido è preferibile rispetto ad uno alcalino in quanto inibisce la possibile crescita di funghi e muffe. Questi tipi di substrato possono però contaminarsi facilmente provocando gravi perdite. Sono disponibili in commercio substrati sintetici come vermiculite e perlite che ben si adattano all'incubazione delle uova di rettile. Per alcune specie si è inoltre dimostrato efficace l'utilizzo di una rete metallica rivestita in plastica in grado di mantenere le uova sospese su uno strato d'acqua.

Con poche eccezioni le uova non dovrebbero mai venire a contatto diretto con l'acqua o raggrinzirsi per scarsa umidità. Entrambe queste condizioni infatti portano alla compromissione degli scambi gassosi attraverso le membrane e alla conseguente morte del feto.

Se necessario le uova possono essere sperate con una fonte di luce concentrata per determinare il normale sviluppo embrionale. Dopo pochi giorni di incubazione solitamente le uova fertilizzate mettono in luce una rete di delicati vasi sanguigni e l'ombra dell'embrione

può essere visualizzata. Le uova di rettili possono inoltre essere sottoposte ad esame ultrasonografico con Doppler per accertare l'accrescimento embrionale⁵³. Molte uova cambieranno forma e colore durante l'incubazione e tali modificazioni non devono essere confuse con alterazioni patologiche.

L'umidità relativa richiesta per la riuscita dell'incubazione di uova di rettile è diversa da specie a specie e di solito varia tra il 65% e il 95%. Le specie tropicali richiedono umidità molto più alta rispetto agli animali deserticoli. Alcuni autori addirittura riportano l'incubazione di uova di specie tropicali al 100% di umidità relativa²⁵.

Numerose ricerche hanno avvalorato la tesi che uno dei fattori più importanti per la riuscita dell'incubazione artificiale è la temperatura. Il range di temperatura ideale per incubare la maggior parte delle uova di rettile sembra essere tra i 25.5 e i 30.0 gradi centigradi. Le specie tropicali e quelle deserticole in genere richiedono alte temperature, mentre altre specie come per esempio i tuatara (*Sphenodon punctatus*) richiedono una temperatura molto bassa (21°C)⁵⁴. Il tempo di incubazione delle specie che vivono in climi temperati è solitamente maggiore rispetto ad animali tropicali o deserticoli.

Generalmente il tempo di incubazione delle uova dei rettili è specie specifico e in alcune fasi dello sviluppo embrionale dipende anche dalla temperatura. Per completare lo sviluppo alcune uova di rettile necessitano di sole due settimane mentre altre specie come ad esempio le uova di cheloni e coccodrilli necessitano di due, quattro mesi o oltre. Lo sviluppo embrionale inizia prima della deposizione. In determinate condizioni ambientali, inoltre, gli embrioni sono in grado di arrestare il loro sviluppo dentro al corpo delle femmine fertilizzate o addirittura nel suolo dove sono state deposte le uova. L'*iguana iguana* ha dimostrato di avere un periodo di sviluppo interno delle uova variabile da 47 a 49 giorni ed un periodo di incubazione esterno dipendente dalla temperatura. Le uova se incubate a 24-25°C, hanno

un periodo di schiusa compreso tra 59 e 85 giorni mentre se in cubate tra 26 e 33°C hanno un periodo di schiusa più breve, inferiore ai 71 giorni. In natura il tempo di schiusa delle uova è di 90 giorni. È stato inoltre dimostrato che le uova di iguana rinoceronte (*Cyclura c. cornuta*) possiedono un tempo di incubazione di circa 100 giorni ad una temperatura di 26.5°C e che tale tempo si riduca fino ad 85 giorni ad una temperatura di 29,5°C. Anche le uova di *Phelsuma madagascariensis* hanno un tempo di schiusa di 40-50 giorni se incubate tra 26.7 e 30 °C che può diventare di 59-80 giorni se incubate tra 23.9 e 26.7°C.

In animali ovovivipari, lo sviluppo fetale varia notevolmente a seconda della temperatura ambientale in cui si trova la madre. La maggior parte delle boa (animali ovovivipari) necessitano per lo sviluppo dei propri piccoli di 280-285 giorni se mantenuti a temperature ambientali simili a quelle naturali mentre questo valore diminuisce sensibilmente a temperature ambientali più alte.

In molte specie di cheloni, la correlazione tra il tempo di incubazione e la temperatura ambientale è simile a quella di sauri e serpenti. In alcune condizioni ambientali inoltre, le uova fertilizzate dei cheloni vengono ritenute fisiologicamente all'interno dell'ovidutto finché le condizioni atmosferiche non consentano la nidificazione.



Fig.5: accoppiamento in tartarughe del genere *Terrapene*.



Fig.6: rituali di accoppiamento in serpenti del genere *Crotalus*

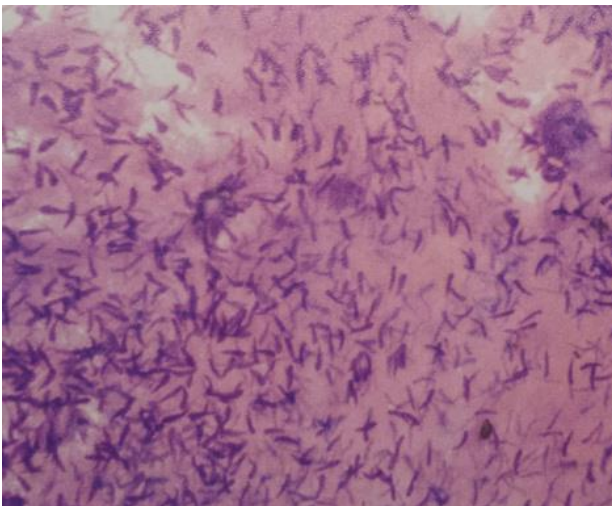


Fig.7: Spermatozoi di *Iguana iguana* fotografati presso la sezione di Clinica Ostetrica Veterinaria dell'Università di Parma



Fig.8: aspetto ecografico di un follicolo ovarico maturo in *Python regius*.

4. DIMORFISMO SESSUALE E TECNICHE DI SESSAGGIO.

Il dimorfismo sessuale nei serpenti è raro e anche quando presente è poco evidente. Solitamente nei maschi, la coda risulta essere più larga rispetto a quella della femmina in quanto nel segmento post-cloacale vi sono alloggiati gli emipeni. Il maschio inoltre, è generalmente più piccolo della femmina a parità di età. E' difficile, indubbiamente, stabilire il genere dei serpenti in base alle dimensioni, se non si hanno due esemplari di sesso opposto a confronto, inoltre bisogna tener conto delle possibili variazioni individuali. Vi sono specie come *Python regius*, *Boa constrictor*, *Elaphe scalaris*, *Natrix tessellata*, *Lamprophis fuliginosus*, *Bitis arietans* e *Aipysurus laevis* in cui è ben riconoscibile questa distinzione, mentre ve ne sono altre che fanno eccezione come per esempio il *Coluber caspus*, il *Coluber gemonensis* e la *Laticauda colubrina*, in cui la femmina è più piccola rispetto al maschio⁵⁵.

Molti cheloni sono sessualmente dimorfici sebbene i caratteri sessuali secondari siano poco apprezzabili nei soggetti giovani e diventino più evidenti dopo la pubertà. In alcune specie si deve aspettare per più di 10 anni prima che il dimorfismo sia evidente.

Le tartarughe di sesso maschile tendono ad avere un pene di grosse dimensioni che può essere estroflesso in caso di situazioni particolarmente stressanti (come per esempio le visite veterinarie). I maschi sessualmente maturi di molte specie di tartarughe inoltre tendono ad avere una coda più lunga e più spessa rispetto alle femmine di pari dimensioni e la distanza tra il margine caudale del piastrone e l'apertura cloacale è maggiore rispetto alle femmine.

Un altro aspetto che può essere utile nel riconoscimento del sesso delle tartarughe adulte è la valutazione della forma del piastrone che nei maschi è solitamente più concavo rispetto a quello delle femmine.

Nella maggior parte dei cheloni inoltre i maschi sono di dimensioni più piccole delle femmine sebbene vi siano alcune eccezioni come per esempio *Geochelone sulcata* e *Chersina angulata*²⁵.

Vi sono poi caratteri sessuali secondari legati alla specie che viene presa in considerazione, in alcune tartarughe appartenenti al genere *Terrapene spp.* il colore dell'iride è rosso acceso nei maschi e giallo-marrone nelle femmine. I maschi di alcune specie semi acquatiche (per esempio *Trachemys spp.*) possiedono unghie particolarmente lunghe e spesse sugli arti anteriori mentre in alcuni esemplari di *Indotestudo elongata* la colorazione della testa e le macchie presenti possono variare tra maschio e femmina durante la stagione riproduttiva. Nelle tartarughe appartenenti al genere *Gopherus spp.* infine, sono presenti dei tubercoli situati sulla porzione ventro-laterale della mandibola (ghiandole mentoniere probabilmente deputate a secernere ferormoni) molto più sviluppati nei maschi rispetto alle femmine²⁵.

Sebbene la determinazione del sesso sia spesso difficile nei soggetti giovani molti sauri adulti hanno dimorfismo sessuale evidente.

I maschi maturi di *Iguana iguana*, per esempio, hanno spine dorsali più sviluppate rispetto alle femmine, possiedono un'ampia giogaia e due emipeni ben evidenti alla base della coda. Molti camaleonti di sesso maschile hanno elaborati ornamenti sulla testa (elmi, corna, creste ecc.) che mancano del tutto nelle femmine (Fig.9). In genere infine i sauri maschi sono più grandi delle femmine di pari età e hanno la testa più sviluppata e i colori più brillanti. I pori femorali o precloacali, ove presenti, sono più sviluppati nei maschi che nelle femmine.

Nonostante tutto comunque anche tra i sauri esistono molte specie come per esempio *Tiliqua scincoides*, *Tiliqua intermedia*, *Gerrhosaurus major* e *Pogona vitticeps* che anche in età adulta non mostrano alcun carattere sessuale secondario evidente rendendone molto difficile il riconoscimento del sesso⁵⁶.

Per garantire migliori performance riproduttive e a causa della non sempre semplice determinazione del sesso nelle diverse di rettili, nel tempo sono state messe a punto diverse tecniche di sessaggio in grado di permettere la distinzione tra maschi e femmine anche negli animali con dimorfismo scarso o addirittura nullo. Data la grande varietà e l'estrema variabilità tra le specie non è possibile determinare quale sia la tecnica migliore in assoluto ma ogni metodica sarà più o meno indicata a seconda delle situazioni.

4.1 PRINCIPALI METODI DI SESSAGGIO CLASSICI UTILIZZATI NEI RETTILI

4.1.1 Eversione manuale degli emipeni

È la più comune metodica utilizzata per il sessaggio dei giovani ofidi ed in particolare dei colubridi. Con l'animale contenuto con il ventre verso l'alto, si preme leggermente il pollice sulla coda facendolo scorrere in senso caudo-craniale dalla coda verso la cloaca. In questo modo la pressione esercitata forza gli emipeni, se presenti, a estroflettersi verso la cloaca. La presenza degli emipeni ovviamente indica che il soggetto è un maschio. I limiti di questa tecnica sono legati al fatto che può essere considerata attendibile al 100% solo nel caso di maschi riconosciuti positivi. I soggetti in cui non vengono visualizzati gli emipeni possono ragionevolmente essere ritenuti femmine solo se la procedura è eseguita da un esperto e l'attendibilità della diagnosi è quindi operatore dipendente. Un altro limite di questa tecnica è che non può essere considerata attendibile in ofidi adulti, in boidi, in molti sauri e nei cheloni¹⁴.

4.1.2 Eversione idrostatica degli emipeni

Questa tecnica esattamente come l'eversione manuale degli emipeni si basa sull'estroflessione di questi organi dalla base della coda, pertanto può essere utilizzata solo

negli ofidi e in alcuni sauri. La procedura prevede l'iniezione di fluido sterile (preferibilmente soluzione salina isotonica) nella coda caudalmente all'eventuale posizione degli emipeni. La pressione idrostatica provocata dal fluido provoca l'eversione degli emipeni e permette la determinazione del sesso. In animali di grandi dimensioni come boidi, varani, iguane e Gila Monster, la forza del muscolo retrattore del pene può però contrastare la pressione idrostatica, pertanto in questi soggetti la procedura deve essere eseguita su pazienti anestetizzati. Questa tecnica deve essere eseguita solo in casi eccezionali in quanto non è scevra da rischi. Il posizionamento dell'ago troppo cranialmente potrebbe provocare l'inoculazione del liquido all'interno dell'emipene rendendo la procedura non solo inefficace ma anche potenzialmente dannosa. Un altro effetto collaterale è legato all'aumento della pressione idrostatica che non solo provoca l'eversione degli emipeni ma potrebbe anche provocare una tumefazione dei tessuti pericloacali rendendo possibili infezioni^{14,57}.

4.1.3 Sonde cloacali

L'utilizzo di sonde cloacali è il principale metodo di sessaggio per gli ofidi adulti e per i sauri di grosse dimensioni. Per questa metodica si utilizzano sonde metalliche dello spessore adeguato al paziente e con punta smussa. Con l'animale contenuto con il ventre verso l'alto la sonda viene gentilmente inserita nella cloaca lateralmente rispetto alla linea mediana e direzionata caudalmente. Con movimenti lenti e delicati si cerca di inserire la punta della sonda all'interno della tasca peniena fino a che non si nota una resistenza. A questo punto si misura la profondità della tasca e si estrae la sonda. Nei soggetti di genere maschile la sonda penetra agevolmente al contrario di quello che accade nelle femmine. In alcune specie (*Varanus spp.*, *Python curtus*) anche i soggetti femminili hanno due diverticoli che si estendono caudalmente rispetto alla cloaca, pertanto è possibile fare confusione. Per

eseguire questa procedura è essenziale utilizzare sonde ben disinfettate, atraumatiche, delle giuste dimensioni e fare molta attenzione a non forzare eccessivamente l'inserimento delle stesse al fine di non causare danni agli emipeni rendendo sterili i pazienti^{14,58}.

4.1.4 Radiografia, ecografia.

L'ecografia può essere utilizzata per monitorare le condizioni riproduttive di molti rettili di sesso femminile. Questo tipo di indagine può essere molto utile ai fini di massimizzare le performance riproduttive di questi animali ma il suo impiego nella determinazione del sesso risulta essere di scarsa rilevanza in sauri e cheloni.

Anche gli esami radiografici possono rendersi utili per il sessaggio di alcune specie di Varani (*Varanus achanturus*, *V. komodoensis*, *V. olivaceus*, *V. gouldi*, *V. salvadorii* ecc.) in quanto questi animali possiedono zone di mineralizzazione dei tessuti molli ("hemibacula") che possono essere facilmente individuate nei maschi^{59,60}.

Alcuni studi dimostrano inoltre come la misurazione della zona pelvica tramite esame radiografico possa essere utile a determinare il sesso delle femmine nei Gila monster.

4.1.5 Sessaggio tramite endoscopia della cavità celomatica.

L'endoscopia è una tecnica relativamente poco invasiva che permette la visualizzazione diretta delle gonadi in entrambe i sessi e anche in soggetti giovani. Siccome però l'utilizzo di questa metodica prevede che i pazienti vengano messi in anestesia, è solitamente utilizzata nei cheloni in quanto non esistono metodiche alternative a parte il riconoscimento dei caratteri sessuali secondari. L'endoscopia può essere effettuata in maniera classica con animale in decubito laterale destro e accesso alla cavità celomatica attraverso la fossa prefemorale sinistra. Dirigendo l'endoscopio in direzione dorso caudale sarà possibile

visualizzare le gonadi anche senza insufflare aria o soluzione sterile all'interno della cavità celomatica. La sua accuratezza risulta essere del 100%⁶¹⁻⁶³. Questa metodica non è l'ideale in tutte le situazioni in particolar modo nei programmi di conservazione delle specie a rischio, perché prevede la cattura e un lungo ricovero degli animali⁶². Uno studio rappresentativo, compiuto su 58 tartarughe della specie *Cuora flavomarginata*, ha dimostrato come questo metodo sia il metodo più accurato per la determinazione del sesso nelle tartarughe non ancora mature, inoltre ha voluto mettere a confronto gli effetti dell'anestesia locale e quella generale durante l'intervento. In questo studio, le 58 tartarughe sono state destinate a subire l'intervento sotto anestesia locale o generale, in modo casuale. L'anestesia generale è stata effettuata con una soluzione, diluita 1:10 in acqua sterile, di morfina (1,5mg/kg), ketamina (10 mg/kg) e medetomidina (0,1mg/Kg). È stata utilizzata un'unica siringa con ago da 27G, iniettando la soluzione nel muscolo grande pettorale a livello dell'arto toracico sinistro. Successivamente, gli animali sono stati lasciati in un'incubatrice a 29° per 30 minuti prima dell'intervento. L'anestesia locale invece, è stata effettuata con una soluzione composta da lidocaina, bicarbonato di sodio e acqua sterile, in modo da ottenere una concentrazione di lidocaina di 0,5mg/ml. È stata poi iniettata sottocute, nell'area prefemorale, 5 minuti prima dell'intervento. Le tartarughe sono state poste in decubito laterale destro, con l'arto pelvico di sinistra represso caudalmente, per esporre la fossa prefemorale sinistra. Prima dell'incisione l'area è stata disinfettata con clorexidina. Con un bisturi è stato effettuato un taglio di 2-3 mm a livello di fossa prefemorale sinistra. L'endoscopio usato per l'intervento era un endoscopio rigido con diametro di 1,9 o 2,7 mm, con una visuale di 30° e rivestito di una guaina protettiva. È stato inserito in direzione dorso caudale, per ispezionare l'apparato riproduttore. Una soluzione di Ringer lattato è stata introdotta nella cavità celomatica, per favorire la distensione addominale e permettere una

migliore visualizzazione. Alcuni ricercatori preferiscono non utilizzare liquidi o gas per insufflare la cavità celomatica, diminuendo i rischi legati alla procedura. Il fluido in eccesso è stato aspirato e l'incisione richiusa con tessuto liquido adesivo. Successivamente all'intervento, i pazienti sono stati trattati con un meloxicam (0,2mg/kg), per via intramuscolare nei muscoli crurali dell'arto pelvico. Per risvegliare gli animali dall'anestesia invece, sono stati utilizzati atipamezolo (0,5mg/kg) e naloxone (0,2mg/kg) per via intramuscolare, rispettivamente nel muscolo grande pettorale di destra e nei muscoli crurali dell'arto pelvico. Le tartarughe sono state monitorate fino al loro risveglio e poi controllate periodicamente dopo 10, 30, 60 minuti. Per valutare i risultati dello studio, sono stati assegnati punti in base alla visualizzazione delle gonadi, in questo modo:

1= eccellente visualizzazione, ottenuta senza nessuna difficoltà con un tempo inferiore a un minuto

2= buona visualizzazione, ottenuta con poche difficoltà, tempo richiesto inferiore ai 3 minuti

3= cattiva visualizzazione, ottenuta con diverse difficoltà, tempo richiesto tra 3 a 10 minuti.

4= impossibile visualizzare le gonadi, tempo richiesto superiore ai 10 minuti

Sono stati assegnati punti anche per quanto riguarda l'anestesia:

1= eccellente anestesia, senza movimenti spontanei

2= buona anestesia, con 1-2 movimenti spontanei

3= discreta anestesia, con 3-5 movimenti spontanei

4=cattiva anestesia, con più di 5 movimenti spontanei

La valutazione dei punteggi per ogni intervento dimostra che la celioscopia, così come è stata effettuata, è un eccellente metodo per la visualizzazione delle gonadi e anche di altri organi interni come: il lobo sinistro del fegato, lo stomaco, l'intestino tenue e crasso, il polmone sinistro, il rene sinistro e la ghiandola adrenale di sinistra. La celioscopia può essere utilizzata

per sessare le tartarughe neonate, senza avere conseguenze negative sulla loro salute. Per quanto riguarda il tipo di anestesia, è risultata maggiormente adeguata quella generale, rispetto a quella locale, che probabilmente non procura una buona analgesia a livello viscerale. Gli effetti collaterali, che si possono manifestare, sono di lieve entità e legati ai farmaci antagonisti dell'anestesia⁶⁴.

4.2 METODI DI SESSAGGIO INDIRETTO

4.2.1 Rilevamento della concentrazione degli ormoni sessuali

Diversi studi riportano come il rapporto tra estradiolo e androgeni nel plasma o nel liquido amniotico sia un possibile metodo per identificare il genere sessuale delle tartarughe. Per effettuare il dosaggio ormonale, è necessario prelevare un campione di sangue di almeno 1 ml ad animale aspetto che rende praticamente impossibile utilizzare questo metodo di sessaggio nelle tartarughe molto piccole e nei neonati⁶⁵. Nello studio di J. A. Mortimer e D. A. Crain, riguardo la specie *Eretmochelys imbricata*, si è potuto rilevare come la concentrazione degli androgeni negli individui di sesso maschile sia molto più elevata che nelle femmine. Il dosaggio radioimmunologico è stato effettuato con anticorpi provvisti di un'alta reattività crociata con diversi tipi di androgeni. Gli individui con una concentrazione di androgeni maggiore di 1000 pg/ml sono stati considerati maschi, mentre al di sotto del valore di 500 pg/ml sono stati considerati come femmine, non è stato possibile identificare alcuni individui con valori di concentrazione intermedi⁶⁶. Sfortunatamente i livelli di testosterone variano non solo a seconda del sesso ma anche in relazione allo stress e questo fattore potrebbe interferire con la veridicità degli esiti dell'esame⁶⁷. In un altro riguardante la specie *Chelonia mydas* il dosaggio ormonale plasmatico è stato messo in relazione a quello

rilevato nel fluido amniotico. Quest'ultimo risulta ugualmente efficace nell'identificazione del sesso dell'animale. Per questo studio è stato utilizzato un dosaggio immunologico chemiluminescente che è molto sensibile e non utilizza radioisotopi⁶⁸. Gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia per confrontare i risultati con quelli ottenuti dall'esame istologico. Le femmine di questa specie erano caratterizzate da alti valori plasmatici di estradiolo, mentre i maschi da alti valori di testosterone. La stessa differenza di genere è stata rilevata anche grazie al dosaggio ormonale del fluido amniotico. Simili riscontri sono stati ottenuti in un altro studio eseguito su tartarughe di specie *Caretta caretta* che ha valutato il rapporto tra estradiolo e testosterone in questo modo: se E_2/T è risultato maggiore o uguale a 1,5 la tartaruga è stata considerata femmina mentre valori inferiori o uguali a 1,5 indicavano individui maschi. In conclusione il dosaggio ormonale degli steroidi sessuali risulta essere un utile metodo per identificare il sesso dell'animale con un'accuratezza di circa 96%, e quando è disponibile, è possibile utilizzare il fluido amniotico delle uova, per evitare i rischi legati al prelievo di sangue⁶⁹.

4.2.2 Determinazione del sesso geneticamente

I cromosomi sessuali dei rettili differiscono molto rispetto a quelli dei mammiferi; invece di essere indicati con le lettere X e Y sono indicati con il sistema Z/W.

La femmina, generalmente, è eterogametica e presenta la combinazione ZW, mentre il maschio, omogametico e ha geni ZZ. E' così soprattutto per le specie dall'origine molto antica, come i boidi e i pitoni, ma in alcuni casi, in particolar modo nella famiglia dei gechi e anche in iguanidi, lacertidi, teidi, scincidi, varanidi e pigopodidi, i maschi sono eterogametici.

In 4 specie di serpenti inoltre sono state trovate tre variazioni: ZZ per il maschio, ZW e ZW^1W^2 per la femmina. Altre varianti sono state trovate nei serpenti *Bungarus caeruleus*, *Enhydrina*

schistosa e *Hydrophis ornatus*: i maschi di queste specie sono caratterizzati dai cromosomi $Z^1Z^1Z^2Z^2$ mentre le femmine rispettivamente da Z^1Z^2W , ZW^1W^2 e ZW .

Questa estrema variabilità tra le diverse specie non rende questa tecnica di sessaggio possibile se non per scopi scientifici²⁵.

4.2.3 Determinazione del sesso in base alla temperatura d'incubazione delle uova

In molti rettili, il sesso non è determinato solo geneticamente, ma anche in base alla temperatura d'incubazione delle uova. Questo accade in tutti i cocodrilli, nel tuatara, in dodici famiglie di cheloni e in alcune specie appartenenti a iguanidi, geconidi e lacertidi. I cromosomi sessuali non sono coinvolti nella determinazione del sesso ed essa avviene durante il primo terzo dello sviluppo embrionale. La temperatura media, durante questo periodo, regola la differenziazione delle gonadi. Il meccanismo fisiologico sembra essere dovuto ai geni che codificano la produzione di determinati enzimi, i quali funzionano in base alle temperature. L'enzima aromatasi è prodotto negli embrioni, che diventeranno femmine, mentre l'enzima 5 alfa reduttasi è prodotto in quelli che diverranno maschi. Questi enzimi sono responsabili della conversione del testosterone (che diventerà diidrotestosterone e porterà alla formazione dei testicoli) e dell'estradiolo (che porterà le gonadi a differenziarsi in ovaie). In alcune specie, alte temperature producono maschi e basse temperature femmine. Questo è il caso della maggior parte dei cocodrilli e della specie *Agama agama*, in cui le uova incubate a 29° originano esemplari maschi, mentre quelle incubate a 26°-27° danno vita a femmine⁷⁰.

Nei cheloni⁷¹ e nella specie *Gecko japonicus*, le femmine sono prodotte a temperature elevate, mentre i maschi a temperature più basse⁷². Nelle specie *Eublepharis macularium* e *Hemitheron caudicinctus* invece, temperature di incubazione molto basse (26°-27°) e

temperature molto elevate (34°-35°) generano femmine. I maschi si originano da temperature d'incubazione attorno i 30°-32°⁷³. In natura, la temperatura d'incubazione delle uova condiziona il rapporto numerico tra i sessi di una determinata popolazione⁷⁴. I siti di deposizione delle uova fanno sì che vi sia sempre un rapporto funzionale tra i generi sessuali, ma alcuni fattori, come una maggiore predazione dei nidi, variazione della temperatura terrestre e cambiamenti climatici possono alterare questo equilibrio. La comprensione di questo fenomeno, potrebbe essere utile per aumentare il quoziente riproduttivo di specie a rischio d'estinzione e sottoposte a progetti di riproduzione in cattività.

4.3 MODERNE TECNICHE DI SESSAGGIO DEI PRINCIPALI RETTILI NON DIMORFICI

4.3.1 Ricerca degli emipeni tramite l'ecografia e la radiografia negli ofidi

L'ecografia, volta al ritrovamento degli emipeni, sembra essere un metodo molto preciso, per la determinazione del sesso nei serpenti. Uno studio compiuto presso il dipartimento di Scienze Medico Veterinarie dell'Università di Parma, ha dimostrato come questo metodo abbia una sensibilità, una specificità e un valore predittivo positivo e negativo pari al 100%. Al contrario dell'ecografia, la radiografia sembra non avere la stessa validità negli ofidi. Sono stati presi in esame ventisette serpenti, nove facenti parte della famiglia dei colubridi: tre maschi e due femmine di *Elaphe guttata*, due maschi di *Lampropeltis getulus californica* e un maschio di *Lampropeltis triangulum honduriensis*. Diciotto esemplari facevano parte della famiglia dei boidi: sei maschi e tre femmine di *Python regius*, due maschi e una femmina di *Molurus bivittatus*, un maschio di *Acanthophis dumerili*, due femmine di *Morella viridis* e una femmina di *Corallus hortolanus*. L'età degli animali era compresa tra i 6 mesi e i 10 anni, molti di essi non erano ancora sessualmente maturi. La maturità sessuale non ha influito sullo

studio, poiché gli emipeni non variano di dimensioni durante la stagione riproduttiva, al contrario dei testicoli. Il diametro della coda, subito posteriormente alla cloaca, è stato misurato precedentemente alle operazioni di sessaggio, i suoi valori erano compresi tra 0,5 e 1,5 cm. Non sono stati utilizzati animali con un diametro della coda inferiore a 0,5 cm. Il motivo di questa scelta, è dovuto al fatto che una coda troppo sottile limita la risoluzione dell'esame ecografico. Prima di iniziare gli esami ecografici e radiografici, sono stati sessati tutti gli animali con l'utilizzo di una sonda cloacale. Per l'ecografia è stato utilizzato un trasduttore lineare, elettronico, da 10 MHz e le immagini ecografiche acquisite sono state quelle longitudinali, trasversali e dorsali. Gli emipeni ecograficamente, apparivano di forma allungata, simile a una canna, con una parete sottile ecogena. All'interno, il contenuto appariva anecogeno o ipoecogeno, soprattutto attorno alla parte muscolare. Le immagini longitudinali e dorsali si sono dimostrate più utili, specialmente quando il diametro della coda era di piccole dimensioni (Fig.10). La cloaca femminile è stata visualizzata, nelle immagini ecografiche longitudinali, come una parte tubulare, che diminuisce gradualmente di dimensioni verso la parte caudale, all'interno il contenuto era anecogeno o ipoecogeno. Nelle immagini trasversali invece, è visualizzata come una struttura ovale. Dopo l'ecografia, è stata effettuata anche una radiografia con mezzo di contrasto su ogni animale. E' stato introdotto nella cloaca, tramite un catetere di polipropilene della grandezza di 24 G, un medium di contrasto composto da una soluzione di acqua non iodata e non ionica (iopimadol; Iopamiro 300 mg/ml). La quantità di mezzo di contrasto utilizzato è stata di circa 0,2-0,5 ml, l'introduzione del liquido si è fermata quando questi ha cominciato a fuoriuscire dalla cloaca. L'animale durante questa operazione è stato contenuto manualmente, in modo da evitare una pressione a livello della coda, che avrebbe potuto interferire con la distribuzione del mezzo di contrasto. Successivamente, gli animali sono stati sottoposti a

radiografia e sono state acquisite proiezioni radiografiche laterali e ventrodorsali. Con quest'ultimo metodo di sessaggio, sono stati rilevati due falsi positivi e due falsi negativi. Al contrario l'ecografia ha dato, in tutti gli esami, risultati veritieri. Sembra che la cattiva distribuzione del mezzo di contrasto abbia influito negativamente nei risultati della radiografia. Detriti cellulari e smegma a livello della guaina degli emipeni possono impedire una corretta distribuzione del mezzo di contrasto e quindi impedire una precisa visualizzazione radiografica. Infine, dallo studio compiuto, si è rilevato che la sviluppata muscolatura della coda dei boidi facilita la visualizzazione ecografica⁷⁵.

4.3.2 Ricerca degli emipeni tramite la radiografia, l'ecografia e la tomografia computerizzata nei sauri

La radiografia con mezzo di contrasto e la tomografia computerizzata possono essere utilizzate nel sessaggio dei sauri, con buoni risultati. Uno studio, compiuto dal dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, dell'Università di Parma, ha voluto mettere a confronto diverse tecniche di sessaggio nei sauri, tra cui l'ecografia, la radiografia con e senza mezzo di contrasto e la tomografia computerizzata con e senza mezzo di contrasto. I risultati ottenuti, hanno dimostrato come l'ecografia non sia il mezzo più affidabile per il riconoscimento degli emipeni e quindi del sesso dell'animale, mentre la radiografia e la tomografia computerizzata con mezzo di contrasto siano tecniche affidabili e accurate in queste specie. I sauri, utilizzati in questo studio, non presentavano dimorfismo sessuale evidente e per questo motivo il loro genere era sconosciuto. Sono state sottoposte a queste tecniche diciotto lucertole, tra cui: otto *Pogona vitticeps*, quattro *Uromastix aegypticus*, tre *Tiliqua scincoides* e tre *Gerrhosaurus major*. L'età degli animali era tra i tre e i sette anni, tutti sessualmente maturi. Gli allevatori che hanno prestato gli animali per questo studio, conoscevano il loro sesso, perché i maschi

si erano accoppiati almeno una volta, mentre le femmine avevano già effettuato una ovo deposizione. Tutti i sauri erano simili per lunghezza e peso, e il diametro della base della loro coda era tra 20 e 26 mm. I maschi sono stati riconosciuti come tali, quando erano individuati gli emipeni, al contrario, se nessuna struttura veniva individuata, erano considerati femmine. Per quanto riguarda l'ecografia, è stato utilizzato un trasduttore lineare da 12 MHz e le immagini ecografiche acquisite sono state quelle longitudinali, dorsali e trasversali. Non è stato possibile effettuare l'ecografia di due *Tiliqua scincoides*, poiché le squame munite di placche ossee impedivano l'esame dei tessuti molli della coda; nel quarto esemplare di *Tiliqua scincoides* è stato, comunque, difficile eseguire l'ecografia. Gli emipeni sono stati identificati tramite ecografia solo in due *Pogona vitticeps* e in un maschio di *Tiliqua scincoides*. Gli emipeni si presentavano come una struttura ovale ipoecogena, lateralmente ai muscoli della coda e appena posteriormente alla cloaca. Negli altri esemplari maschi di *Pogona vitticeps*, l'ecogenicità degli emipeni si è mostrata simile a quella dei muscoli della coda, rendendo le immagini di difficile interpretazione. Dopo l'ecografia, è stata effettuata una radiografia e una tomografia computerizzata su tutti gli animali (Fig.11). Successivamente è stato inoculato nella cloaca, un mezzo di contrasto non iodato e non ionico, in acqua idrosolubile, ripetendo la radiografia e la tomografia computerizzata. Per l'inoculazione è stato utilizzato un catetere venoso da 24 G, ed è stata sospesa l'immissione del mezzo di contrasto, dopo che questi fuoriusciva dall'apertura cloacale. Durante questa operazione, l'animale è stato contenuto manualmente, evitando pressioni a livello della coda, per non ostacolare la distribuzione del mezzo di contrasto. Durante la radiografia, l'animale anestetizzato è stato posto in decubito ventrale e mantenuto in tale posizione tramite bende e schiuma. Le proiezioni acquisite con la radiografia sono state quelle laterali e latero-dorsali. La radiografia, effettuata con il mezzo di contrasto, visualizzava gli emipeni

come strutture a forma di spillo caudalmente alla cloaca. Nelle femmine invece, il mezzo di contrasto veniva visualizzato come una linea opaca, a forma di mezzaluna, nella cloaca. In un esemplare di *Uromastix aegypticus* il mezzo di contrasto non si è distribuito correttamente e la radiografia è risultata equivoca. La tomografia computerizzata con e senza mezzo di contrasto è stata effettuata utilizzando uno scanner elicoidale a singola fetta e i sauri sono stati posti in decubito ventrale per mezzo di bendaggi. Quando non è stato somministrato il mezzo di contrasto, sono stati riconosciuti come maschi solo un esemplare di *Tiliqua scincoides* e due di *Gerrhosaurus major*. Gli emipeni sono visualizzati come strutture appuntite e affusolate, nella parte ventro-caudale della cloaca. I risultati erano equivoci negli esemplari di *Uromastix aegypticus* e di *Pogona vitticeps*. Una volta somministrato il mezzo di contrasto, la tomografia è risultata efficace in tutti gli animali, con una buona visualizzazione di entrambi gli emipeni. In conclusione, questo studio ha dimostrato che il metodo più preciso, per sessare questo tipo di animali, è la tomografia computerizzata quando essa è eseguita con il mezzo di contrasto. Questa tecnica però è molto costosa e complicata. La radiografia con mezzo di contrasto è sicuramente una buona tecnica, se non nei casi in cui il mezzo di contrasto, per la presenza di detriti cellulari e smegma, non si distribuisce adeguatamente sulla guaina degli emipeni. L'ecografia, la radiografia e la tomografia computerizzata senza mezzo di contrasto sono invece inutilizzabili nei sauri, perché non danno risultati affidabili. Si è inoltre rilevato che il mezzo di contrasto non provoca effetti avversi⁷⁶.

4.3.3 Cistoscopia nei cheloni neonati

Un metodo valido e facilmente realizzabile per il sessaggio dei cheloni anche prepuberi è la cistoscopia. In un recente studio la cistoscopia è stata effettuata su quindici cheloni deceduti

e venticinque cheloni vivi, anestetizzati. Gli animali vivi facevano parte della specie *Testudo hermanni*, mentre sette cheloni deceduti erano *Trachemys scripta scripta*, quattro *Testudo marginata* e quattro *Testudo hermanni*. Tutti gli animali avevano un'età inferiore ai cinque mesi e le loro dimensioni variavano da 32,4 gr a 75 gr per il gruppo di cheloni non più in vita e da 27,3 gr a 57,8 gr, per l'altro gruppo. Gli animali vivi hanno riposato per un giorno a digiuno in una zona riscaldata (26-29 gradi) e successivamente sono stati anestetizzati con una soluzione di morfina solfato (1,5 mg/Kg), dexmedetomidina (0,1 mg/kg) e ketamina idroclorato (10 mg/kg), somministrata in un'unica siringa, per via intramuscolare, a livello del grande muscolo pettorale sinistro. L'animale da analizzare è stato tenuto con la mano sinistra, in decubito ventrale e poi con la mano destra, è stato introdotto in cloaca un endoscopio di 2,7 mm, con una visuale di 30°, ricoperto da un astuccio protettivo. Una volta in cloaca, l'endoscopio è stato direzionato verso l'apertura uretrale. Per distendere la vescica e favorire la visualizzazione delle gonadi è stata iniettata una soluzione di Ringer lattato a 30° (una goccia ogni 3-4 secondi). Una volta inserito all'interno della vescica, l'endoscopio è stato diretto dorsalmente. Grazie alla sottile e trasparente parete della vescica, si sono potute visualizzare facilmente gli organi sessuali (Fig. 12). Le gonadi femminili apparivano come strutture ovali, bianche e leggermente convolute. All'interno si potevano scorgere follicoli biancastri di varie misure. Le gonadi maschili invece, si presentavano come strutture ovali, gialle e con una ricca rete di vasi sanguigni sulla superficie. Il tempo per l'esame cistoscopico si è rivelato molto breve, circa 90 secondi. Le tartarughe decedute sono state sottoposte immediatamente a necropsia ed è stato effettuato un esame istologico, per verificare la presenza delle gonadi maschili e femminili. Lo studio ha valutato anche le possibili alterazioni della vescica dopo la cistoscopia. Nelle tartarughe sottoposte a necropsia non è stata rilevata alcuna anomalia. Il gruppo delle tartarughe vive, è stato monitorato fino al risveglio

e trattenuto in un dipartimento dell'ospedale per sei giorni, prima di essere restituito ai proprietari. Non hanno dato manifestazioni cliniche, eccetto quattro di esse, che hanno presentato emesi dopo l'intervento. Si suppone che l'emesi, sia stata provocata dall'atipamezolo, usato per indurre il risveglio dall'anestesia, somministrato per via intramuscolare, a livello del grande muscolo pettorale di destra. Un'altra possibile causa di emesi, potrebbe essere stata la compressione dello stomaco da parte della vescica dilatata in corso di cistoscopia. In generale, questo metodo si è dimostrato non invasivo per le tartarughe, facilmente ripetibile in diversi tipi di tartarughe e di breve durata. Le poche difficoltà che si possono riscontrare con questo metodo, si verificano se la vescica e i visceri sono ingombri di materiale, la visualizzazione delle gonadi può non essere agevole. Inoltre, passando dal proctodeo, l'endoscopio può veicolare microrganismi all'interno della vescica. Un esame delle urine prelevate tramite cistocentesi può dare informazioni riguardo a questa eventualità⁷⁷.



Fig.9: presenza di un elmo ben sviluppato in un esemplare maschio di *Chamaeleo calyptratus*.

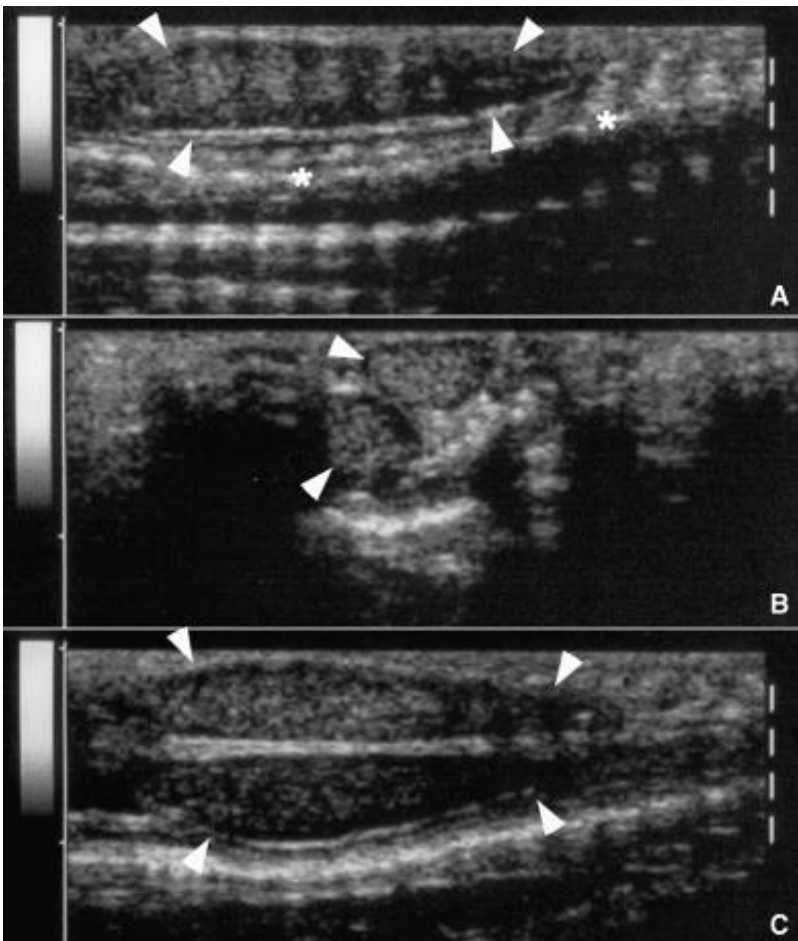


Fig.10: immagini ecografiche di emipeni di *Lampropeltis triangulum honduriensis* (freccie). A: immagine longitudinale, B: immagine trasversa, C immagine dorsale. (*) corpi vertebrali

Da: Gnudi G. et.al: USE OF ULTRASONOGRAPHY AND CONTRAST RADIOGRAPHY FOR SNAKE GENDER DETERMINATION. Radiology & Ultrasound, Vol. 50, No. 3, 2009, pp 309–311.

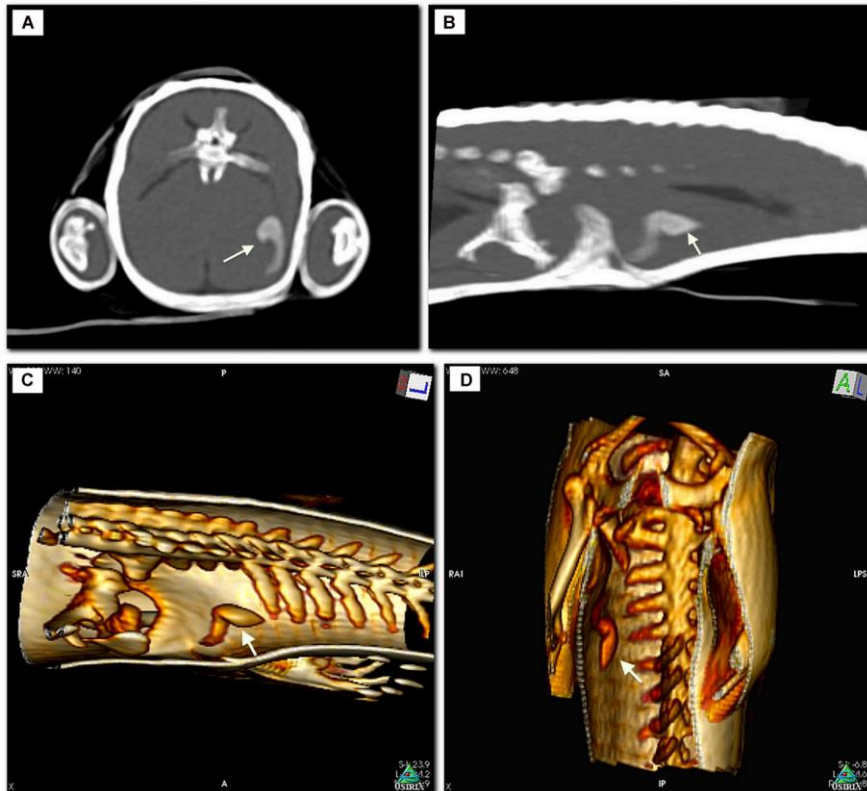


Fig.11: tomografia computerizzata in un esemplare maschio di *Tiliqua scincoides*. A: immagine trasversa della sezione retrocloacale. Si può notare l'emipene di sinistra ripieno di materiale iperdenso. B: proiezione laterale della base della coda. Anche in questo caso l'emipene è visibile. C-D ricostruzione tridimensionale della base della coda.

Da: Di Ianni et al.: DIAGNOSTIC SENSITIVITY OF ULTRASOUND, RADIOGRAPHY AND COMPUTED TOMOGRAPHY FOR GENDER DETERMINATION IN FOUR SPECIES OF LIZARDS. *Vet Radiol Ultrasound*, Vol. 56, No. 1, 2015, pp 40–45.

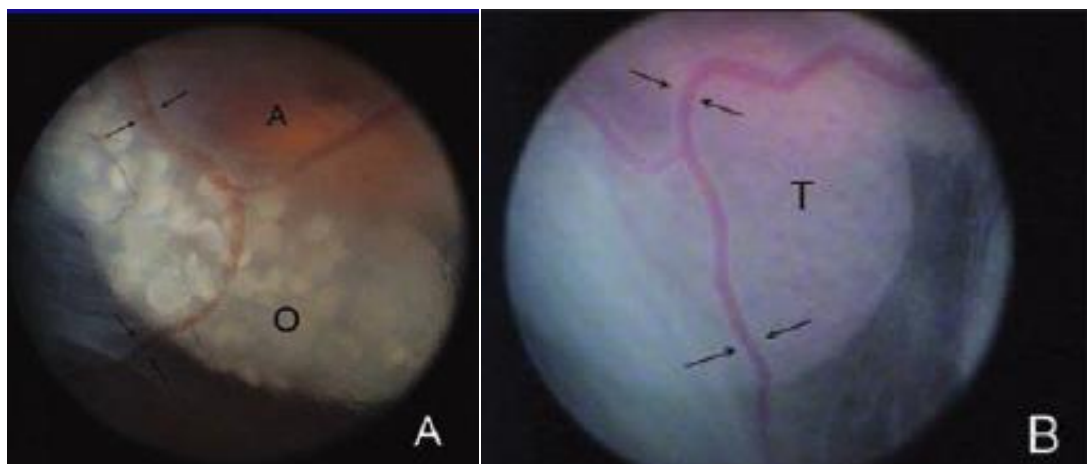


Fig.12: A: aspetto cistoscopico di un ovaio (O) in un giovane esemplare di *Testudo hermanni*. B: aspetto cistoscopico di un testicolo (T) in un giovane esemplare di *Testudo hermanni*.

Da: Selleri P et al.: Cystoscopic sex identification of posthatchling chelonians. *JAVMA*, Vol 242, No. 12, June 15, 2013

5. PRINCIPALI PATOLOGIE RIPRODUTTIVE

5.1 Morte embrionale

Una delle più comuni nonché problematiche patologie che vengono riscontrate nella pratica veterinaria e documentate in letteratura, è la morte degli embrioni perfettamente sviluppati prima della schiusa. Questa è una patologia ad eziologia multifattoriale. Tra le principali cause che possono portare alla morte del feto ci sono:

Temperatura inadeguata: è noto che la temperatura di incubazione gioca un ruolo rilevante, non solo sulla determinazione del sesso, ma anche sul corretto sviluppo dell'embrione. Oltre al valore assoluto della temperatura anche la rapidità con cui si verifica l'escursione termica nel tempo incide sulle performance riproduttive delle specie ovipare. Variazioni repentine possono portare a morte l'embrione che non riesce a contrastare gli effetti dello stress termico a cui è sottoposto⁷⁸.

Umidità inadeguata: le conseguenze degli sbalzi di umidità sono più marcate nelle specie che presentano uova con il guscio sottile, rispetto a quello in cui lo strato minerale è più spesso. Maggiore è lo spessore del guscio, minore sarà la suscettibilità alle variazioni di umidità⁷⁹.

Scambi gassosi insufficienti: durante lo sviluppo dell'embrione all'interno dell'uovo si assiste ad un marcato consumo di ossigeno parallelamente ad un aumento della quantità di anidride carbonica⁸⁰. Sebbene questa rarefazione di ossigeno sia lo stimolo fondamentale per la schiusa, alcuni autori ritengono che possa essere una delle cause dei decessi embrionali, specie per quanto riguarda uova incubate artificialmente. Diversi studi hanno dimostrato come la temperatura d'incubazione giochi un ruolo determinante sugli scambi gassosi: hanno notato come, nella maggior parte delle uova incubate ad una temperatura di 32°, gli embrioni mostrassero un consumo di ossigeno maggiore rispetto a quelli incubati a 27°. È

quindi dimostrato come una temperatura di incubazione superiore a quella fisiologia indebolisca gli embrioni, rendendoli maggiormente sensibili all'ipossia⁸¹.

Iponutrizione: le riserve nutritive dell'embrione dipendono esclusivamente da quelle immagazzinate nel tuorlo. Se la madre è sottoalimentata o comunque non riesce ad apportare la giusta quantità di vitamine, acido folico e altri nutrienti, aumenta drammaticamente la probabilità che sopraggiunga la morte per la prole. Un macroelemento che deve essere somministrato alla madre durante la gravidanza in quantità adeguate è il calcio. Una sua carenza comporta severe difficoltà nel sintetizzare il tuorlo e deficit di calcificazione del guscio, compromettendo il normale sviluppo del feto e predisponendolo a un grave stress. La malnutrizione della madre è una causa che deve sempre essere valutata ed indagata nei casi di morte precoce dell'embrione⁸².

Errata ovodeposizione: le uova dei rettili sono più sensibili agli spostamenti all'interno del nido rispetto a quelle degli uccelli. Un cambiamento di posizione influisce sulla vitalità dell'embrione in quanto riduce la capacità di schiusa e può provocare danni alle strutture fetali. Una rotazione energica e marcata può causare rottura delle membrane del corion e dell'allantoide stirando e chiudendo i vasi sanguigni e interrompendo la vascolarizzazione e quindi la nutrizione del feto. Altro effetto imputabile alla rotazione è lo spostamento del tuorlo, che andrebbe a schiacciare con il suo peso il futuro nascituro. Anche le vibrazioni eccessive possono comportare le stesse conseguenze di una rotazione⁸³.

Infezioni: le infezioni non sono molto comuni, ma sono comunque cause da valutare in una diagnosi differenziale. Possono derivare da salpingiti, contaminazioni cloacali oppure dall'ambiente circostante. Non sono riportati patogeni specifici causanti mortalità embrionale nei rettili.

Cause iatrogene: errate manualità o scarsa delicatezza nel maneggiare le uova possono provocare traumi e morte embrionali.

Altre cause: ulteriori possibili cause di morte embrionale sono: accumulo di tossine ed effetti collaterali da farmaci. Solitamente, la morte per uno di questi eventi, oltre ad essere molto rara, è tardiva. Un'altra possibilità è legata all'età della madre: una paziente geriatrica potrebbe aver difficoltà a produrre tutte le sostanze e i nutrienti richiesti dalla prole per il suo sviluppo, influenzando negativamente la qualità dell'uovo e del guscio e riducendo le possibilità di sopravvivenza.

Vista la grande varietà di cause che possono condurre a morte gli embrioni, la diagnosi presenta un grado di difficoltà abbastanza elevato. L'anamnesi diviene così un mezzo estremamente importante e deve essere raccolta nella maniera più precisa ed accurata possibile. Un'accurata necropsia e il reperimento di campioni di tessuti e annessi dell'embrione per gli esami istopatologici sono sempre caldamente raccomandati. È auspicabile anche eseguire esami batteriologici, per valutare la presenza o meno di infezioni. Se si sospetta un'intossicazione, devono essere eseguiti gli esami tossicologici.

La prevenzione risulta comunque l'arma migliore per combattere questa patologia.

5.2 Distocia

Quando si parla di distocia nei rettili, si intendono tutte quelle situazioni in cui si ha una mancata espulsione e deposizione del prodotto del concepimento entro tempi fisiologici.

Il rilevamento di uova con diverso grado di calcificazione attraverso le radiografie non è un reperto inusuale e quindi non è un segno patognomonico di distocia.

Questa patologia è complessa e può dipendere da diverse cause. Inoltre può sfociare in malattie sistemiche a volte molto severe.

Ogniqualvolta si ha a che fare con un rettile che mostra segnali di sofferenza, bisogna considerare la possibilità di una gravidanza problematica in corso.

Se le uova ritenute sono di dimensioni abnormi, aumenta il rischio di ostruzione cloacale, con conseguente anuria e mancanza di defecazione.

Le distocie possono essere classificate in ostruttive e non ostruttive in base alle cause⁸⁴.

Si parla di distocia ostruttiva quando si verificano delle condizioni per cui viene impedito il corretto passaggio delle uova lungo il tratto riproduttivo (Fig.13). Le cause possono dipendere dalla madre o dalle caratteristiche delle uova.

Fra le prime si annoverano malformazioni della pelvi, degli ovidutti oppure la presenza di masse che comprimono sull'utero o sugli ovidutti come ascessi o calcoli.

Dimensioni abnormi e/o malformazioni di uova o embrioni sono altre cause che possono portare a distocie⁸⁵.

Nel caso di distocia non ostruttiva le uova rinvenute sono solitamente di dimensioni normali e la conformazione anatomica della madre è fisiologica. L'eziologia è da ricercare in difetti comportamentali, ambientali e patologici.

Le distocie possono essere causate da alterazioni del comportamento materno associate ad un inadeguato sito di deposizione: competizione per la zona, aumento dell'aggressività, sovraffollamento, presenza di maschi eccessivamente bellicosi e fonti di disturbo esterne.

L'incapacità di trovare un substrato adatto e le condizioni ambientali ideali possono indurre le femmine a ritenere le uova al loro interno e quindi aumentare il rischio di incorrere in distocia.

Patologie come infezioni pregresse, malattie sistemiche, malattie debilitanti, endocrinopatie e scompensi nell'equilibrio idro-salino inducono le madri ad abbandonare tutte le attività

riproduttive favorendo la ritenzione delle uova, dovuta anche ad una perdita del tono muscolare^{86,87}.

Non esistono sintomi specifici e patognomonic di distocia. La malattia diviene evidente e conclamata solamente in presenza di complicazioni.

I sintomi solitamente riportati in letteratura comprendono: paresi delle zampe posteriori, posture anormali, anoressia, letargia, inattività, scolo cloacale, ritenzione fecale, anuria, possibili prolassi.

L'anamnesi può fornire informazioni importanti per identificare la distocia. Cattiva gestione dell'animale, errata alimentazione e inadeguata area per la nidiata sono gli errori più comuni commessi dai proprietari ed allevatori.

Il ricorso alla diagnostica per immagini (Fig.14) può rivelarsi un'arma a doppio taglio, in quanto è fondamentale differenziare la distocia da una normale gravidanza. In questo senso ci viene in aiuto appunto l'anamnesi e la raccolta di tutti i dati relativi a cicli riproduttivi e calori.

Possono rivelarsi utili ai fini diagnostici anche esami del sangue al fine di valutare eventuali infezioni in atto.

Per facilitare la diagnosi, si può ricorrere anche alla ultrasonografia⁸⁴.

Gli approcci terapeutici possibili sono vari a seconda della specie animale e della situazione.

Fornire un'area adeguata per la nidiata: se la distocia non è ostruttiva si può cercare di incoraggiare l'animale a deporre autonomamente le uova creando un idoneo luogo di deposizione

Trattamento medico: l'espulsione delle uova ritenute nei rettili può essere ottenuta mediante l'induzione con ossitocina.

L'ossitocina è un ormone prodotto dall'ipotalamo e secreto dalla neuroipofisi. Possiede un effetto stimolante le contrazioni della muscolatura liscia uterina e del tratto genitale femminile.

Il suo utilizzo, associato alla somministrazione di Beta-bloccanti, supplemento di calcio e fluidi, è solitamente risolutivo nei casi di distocia non ostruttiva.

Viene consigliato di somministrare del calcio prima dell'ossitocina per migliorare e facilitare la contrazione della muscolatura, soprattutto in animali malnutriti e con un errato rapporto Ca/P.

È inoltre opportuno somministrare fluidi (cristalloidi) e lubrificare la cloaca prima di incominciare il trattamento farmacologico.

La quantità di calcio gluconato da utilizzare suggerita in letteratura è pari a 10 mg/kg intramuscolo o sottocute i volta al dì per 2 o 3 gg prima della somministrazione dell'ormone. Anche l'utilizzo di Beta-bloccati come l'atenolo e il propanololo, prima della somministrazione di ossitocina, è descritto in quanto contribuisce al rilassamento delle fibre muscolari di utero e ovidutti. La dose di atenololo da somministrare è pari a 7 mg/kg per via orale⁸⁸.

L'ossitocina viene somministrata alle dosi di 1/3 UI/kg per via intramuscolare. Solitamente è dispensata una volta al giorno ma anche più somministrazioni sono tollerate. Difatti, se l'espulsione delle uova non è avvenuta dopo una singola dose, si può ripetere, dimezzando la quantità, dalle quattro alle dodici ore dopo. Nelle tartarughe, mediamente dopo 30/60 minuti incominciano le contrazioni uterine. Nelle specie acquatiche, tuttavia i tempi sono più lunghi.

È possibile, in alternativa, somministrare il farmaco in infusione per via intraossea^{89,90}.

Uno studio condotto presso l'Università veterinaria di Parma ha comparato le somministrazioni di ossitocina per via intramuscolare e per via intravenosa, confrontando le tempistiche con le quali incominciano le contrazioni e avviene la completa ovodeposizione. Per questo, sono stati utilizzati due gruppi da quindici *Trachemys scripta elegans* con distocia non ostruttiva, uno sottoposto a somministrazione intramuscolare a livello di arti anteriori ed uno a puntura intravenosa, effettuata a livello di vena coccigea dorsale. I risultati dimostrano come, grazie alla terapia intravenosa, i tempi di induzione delle contrazioni siano assai minori, rispetto a quella intramuscolare. Inoltre con la prima sono stati necessari meno dosi successive e in un numero minore di animali: tutti i pazienti del gruppo "intramuscolare" hanno necessitato una seconda dose, somministrata dopo circa 60 minuti.

Questo studio ha documentato per la prima volta che è possibile somministrare dosi più basse rispetto a quelle riportate solitamente in letteratura ottenendo comunque un ottimo risultato. Dosi eccessive potrebbero causare contrazioni troppo veementi e portare ad una rottura delle uova ritenute e quindi ad una celomite. Durante il lavoro non sono stati rinvenuti nessun tipo di effetti collaterali⁹¹.

Un ormone utilizzabile in alternativa all'ossitocina è l'arginina vasotocina. Risulta essere l'effettivo analogo dell'ossitocina nei rettili. La sua efficacia si è dimostrata maggiore ed è utilizzata nei casi in cui l'ossitocina non riesce a risolvere la situazione. Questo farmaco ha però il difetto di essere altamente instabile e molto costoso⁸⁹.

Trattamento chirurgico: nel caso in cui il trattamento farmacologico dovesse fallire o non fosse attuabile, oppure in casi di distocia ostruttiva è possibile ricorrere alla chirurgia.

La salpingectomia è senza dubbio la scelta primaria in caso di distocia ostruttiva o fallaci trattamenti medici. Nella fase pre-operatoria, devono essere somministrati antibiotici ed analgesici, oltre ad una corretta fluidoterapia. Uno studio radiografico completo, per

verificare che non ci siano state rotture di uova all'interno del paziente, è sempre raccomandato prima di iniziare l'intervento. Inoltre permette una localizzazione certa delle uova, onde evitare traumi iatrogeni di qualsiasi genere.

A seconda della specie considerata l'approccio chirurgico può cambiare.

In sauri e ofidi si esegue un accesso paramediano a livello di linea alba (Fig.15-16) mentre nei cheloni si utilizzano tecniche transcarapaciali generalmente molto invasive. In caso specie in cui il piastrone risulti molto ridotto è possibile anche utilizzare un accesso prefemorale.

Qualsiasi sia l'approccio scelto, dopo aver aperto la breccia operatoria, si devono esaminare i visceri contenuti all'interno della cavità celomatica al fine di individuare eventuali aree necrotiche da asportare o la presenza di materiale contaminato e/o putrescente. In tal caso si deve procedere con una pulizia ed un lavaggio della zona con abbondante soluzione fisiologica sterile.

Dopo aver valutato le condizioni dei visceri, si cercano gli ovidotti, si esteriorizzano, si incidono al fine di estrarre tutte le uova ed eventualmente si procede con l'asportazione dell'apparato riproduttore⁹².

Bisogna avere l'accortezza di rimuovere tutte le uova ectopiche, e valutare l'eventuale presenza di emorragie o traumi.

Dopo aver rimosso sia le uova che gli organi genitali, si procede alla sutura dei vari piani e delle ferite chirurgiche, utilizzando un monofilamenti riassorbibili, e successivamente al risveglio del paziente.

Se eseguita correttamente, la salpingectomia (o l'ovariosalpingectomia) garantisce buoni risultati e una buona convalescenza, specie se il paziente è ben stabilizzato e correttamente ospedalizzato⁹³.

L'aspirazione del contenuto delle uova (ovocentesi) è un altro possibile intervento volto a risolvere il problema della ritenzione di uova. Risulta essere una valida ed efficace opzione nei casi in cui il trattamento farmacologico risulta fallace o l'intervento di salpingectomia sia impraticabile.

L'ovocentesi risulta essere una risorsa idonea in caso di distocie ostruttive, causate da uova troppo grosse che non riescono ad impegnarsi nel canale pelvico.

Prima di intraprendere la pratica chirurgica, è opportuno somministrare sia una dose di ossitocina che di beta-bloccanti, la cui sinergica azione permette di rilassare la parete uterina e diminuire le resistenze opposte all'introduzione degli strumenti.

Anche in questo caso, è essenziale eseguire uno studio radiografico prima dell'intervento per individuare la posizione delle uova e valutarne dimensioni e consistenza.

La strumentazione da utilizzare deve comprendere una ago 18G X 2", una siringa da 5 o 10 ml, un contenitore per raccogliere il materiale aspirato, una siringa per il lavaggio e uno speculum.

A seconda della specie considerata l'ovocentesi può essere eseguita sia per via transcutanea (ofidi e sauri) che per via cloacale (cheloni).

Dopo aver anestetizzato il paziente, somministratogli i farmaci miorilassanti e preparato il campo operatorio, si localizzano le uova tramite palpazione, visualizzazione ecografica o tramite l'introduzione di uno speculum attraverso la cloaca (cheloni) e si perfora il guscio delle stesse aspirandone tutto il contenuto. Terminata la fase di aspirazione in sauri e cheloni è possibile applicare una leggera pressione sulla parete della cavità celomatica per favorire l'espulsione delle uova mentre nei cheloni è opportuno procedere con lavaggi cloacali ripetuti. Solitamente i residui di guscio vengono espulsi nelle ore seguenti alla procedura^{94,95}.

5.3 Stasi follicolare

Per stasi follicolare si intende la incapacità di produrre sufficiente quantità di progesterone da corpi lutei perfettamente funzionanti. Questo ormone ha la funzione di stimolare la regressione dei follicoli che non hanno ovulato e interrompere quindi un nuovo ciclo estrale. Come per la distocia, l'eziologia della stasi follicolare è variegata e molto ampia: le cause possono essere sia ambientali che patologiche. Alcuni autori sostengono che una possibile causa sia la mancanza di stimoli sociali provenienti da altri animali. Si è difatti notato che femmine che erano state immerse in gruppo a contatto con diversi esemplari maschi dopo un lungo isolamento sono più sensibili a questa patologia. Si presume che la motivazione sia dovuta ad una induzione dell'ovulazione associata ad una incapacità di mantenere i corpi lutei per lunghi periodi. La carenza di stimoli ambientali come luce, calore ed adeguata umidità predispone i rettili ad una squilibrata follicologenesi e alla conseguente incapacità di coordinarsi con i cambiamenti climatici giornalieri ed annuali, mancando così l'ovulazione. Gli animali allevati in cattività, sia all'interno della casa sia all'esterno ma in regioni dal clima non ideale, sono molto più predisposti alla stasi follicolare rispetto agli esemplari che vivono in natura (Fig.17)⁹⁶. L'errata gestione o le lacune nella preparazione dell'ambiente domestico sono fra le principali cause di sviluppo di questa patologia. Non è raro inoltre che questa malattia sia secondaria a malnutrizione cronica e a patologie debilitanti e cachettizzanti ad andamento cronico non diagnosticate e quindi non trattate prontamente. Nelle fasi più precoci della malattia, non sono evidenti segni clinici eclatanti o patognomonic. I sintomi si palesano quando la situazione è in stadio avanzato e l'iperestrogenismo indotto produce i suoi primi disordini sul metabolismo del paziente. I sintomi non sono specifici e sono molto vaghi e simili a quelli della distocia. Si osservano: letargia, anoressia prolungata, assenza di

defecazione ed urinazione, inattività e aumento del peso. I parametri biochimici possono essere alterati e mostrare un aumento dei valori di calcio, fosforo, albumina e proteine totali. La diagnosi clinica viene fatta essenzialmente per esclusione. Come per la distocia, anche in questo caso l'anamnesi e la raccolta del maggior quantitativo di informazioni è fondamentale per indirizzarsi verso il riconoscimento della patologia. Un quadro più preciso può essere ottenuto mediante l'analisi degli esami ematologici e biochimici. In caso di stasi follicolare si riscontreranno: ipercalcemia, iperalbuminemia, un aumento delle proteine totali, possibile iperestrogenismo. Anche il colesterolo e i trigliceridi potrebbero aumentare, specie se la stasi si accompagna a lipidosi epatica, una delle più frequenti patologie associate ad essa⁹⁶.

Altra indagine diagnostica usufruibile è l'ultrasonografia in grado di visualizzare i follicoli ritenuti e di misurarne le dimensioni. Anche mediante l'endoscopia è possibile giungere alla diagnosi di stasi follicolare. Le caratteristiche dei follicoli che possono indurre il sospetto sono le stesse dell'ultrasonografia. I trattamenti possibili per risolvere la stasi sono essenzialmente di due tipi: medico e chirurgico.

Trattamento Medico: prevede l'utilizzo del progesterone. Infatti questo ormone induce regressione dell'ovaio e dei suoi follicoli. Il trattamento è funzionale su soggetti che sono sensibili a questa molecola, quindi in una determinata fase del ciclo ovarico; in pazienti di una certa età, l'efficacia diminuisce. Il trattamento farmacologico deve essere evitato in pazienti con patologie epatiche gravi, come la lipidosi epatica. Infatti, dopo la regressione, la maggior parte delle sostanze contenute all'interno dei follicoli viene assimilata dal fegato per essere metabolizzata. In caso di compromissione epatica, si correrebbe il rischio di aggravare la patologia in atto, mettendo a rischio la vita del paziente. I valori biochimici ed ematici, l'appetito e l'attività fisica ritorneranno nella norma solamente dopo alcuni mesi, cioè dopo

che la maggior parte dei follicoli sono andati in contro ad atresia. Lo svantaggio maggiore del trattamento farmacologico è la variabilità nell'efficacia e nella qualità del risultato.

Trattamento chirurgico: nei casi in cui il trattamento medico non sia attuabile o non risulti efficiente, la chirurgia può risolvere il problema. L'ovariectomia è l'intervento d'elezione per curare definitivamente il paziente, specie in casi cronici. Le tecniche chirurgiche sono del tutto analoghe a quelle riportate per la distocia ponendo particolare attenzione a non contaminare il campo operatorio e a non rompere nessun follicolo. Asportate le ovaie, si rilasciano giacere gli ovidutti all'interno e si provvede a richiudere la breccia operatoria. Non sono stati riportati molti studi sulle possibili conseguenze quali osteoporosi ed obesità, ma la maggior parte della casistica analizzata non evidenzia nessuna di queste evenienze dopo l'intervento chirurgico⁹⁶.

5.4 Prolasso

Per prolasso si intende la fuoriuscita di un organo attraverso un orifizio del corpo. Nei rettili, diversi organi possono prolassare attraverso la cloaca: la porzione terminale dell'apparato gastroenterico, la vescica urinaria, il pene nel maschio (cheloni) e gli ovidutti nella femmina. In sauri e ofidi gli emipeni possono prolassare dalle rispettive tasche in seguito ad eccessiva attività sessuale⁹⁷. La corretta identificazione del viscere prolassato è estremamente importante e deve essere effettuata prima di decidere qualsiasi tipologia di trattamento ed intervento. In caso di prolasso della vescica, la struttura che protrude appare come un largo sacco traslucido; il colon si presenta come una struttura tubulare spesso imbrattata di feci; il pene prolassato è una solida massa di tessuto senza lume che sporge dalla cloaca spesso edematosa, mentre gli ovidutti appaiono come struttura tubulare, priva di feci, con striature longitudinali della mucosa.

Le cause ed i fattori predisponenti sono diversi e coinvolgono apparati e funzioni differenti dell'organismo.

Il prollasso del pene (Fig.18) o degli emipeni è dovuto a diverse cause, fra le quali si annoverano infezioni, eventi traumatici avvenuti durante l'atto sessuale, separazione forzata dalla femmina, costipazione, disfunzioni neurologiche e/o lesioni muscolari del muscolo retrattore del pene, attività sessuale eccessiva, problemi legati alla muta⁹⁸.

Nella femmina il prollasso degli ovidutti ha cause paragonabili a quello del pene nel maschio: masse in cavità celomatica, traumi iatrogeni e non, ma le principali rimangono le infezioni uterine e dell'apparato genitale. Patologie che sono fattori predisponenti ai prollassi di tutti gli organi citati sono malattie metaboliche debilitanti come la disidratazione, l'ipocalcemia, la chetoacidosi, l'obesità e l'iperestrogenismo e la malattia ossea metabolica.

In caso di prollasso, la prima cosa da fare è identificare con esattezza il viscere prollassato. Per diminuire la sofferenza del paziente è possibile somministrare degli anestetici locali durante la visita clinica. La tempestività di intervento è fondamentale per evitare complicazioni quali congestione venosa e necrosi ischemica. Nei casi acuti e non complicati è possibile la riduzione manuale dell'organo, dopo un accurato lavaggio e attenta pulizia. Se questo non dovesse essere possibile, l'utilizzo di lubrificanti e pomate antibiotiche garantisce all'organo una protezione efficiente.

In alcuni casi di prollasso i tessuti esposti possono essere notevolmente dilatati; un agente igroscopico come la glicerina o una soluzione di saccarosio concentrato può essere utilizzata per la riduzione dei tessuti induriti. In tutti i casi di prollasso è necessario irrigare abbondantemente l'organo per evitare danni da disidratazione⁹⁹.

Alcuni autori consigliano di praticare una episiotomia, ovvero una incisione al margine della cloaca, per facilitare la riduzione di organi gravemente traumatizzati ed irriducibili manualmente.

Una volta riposto il viscere all'intero, si può eseguire una sutura a borsa di tabacco attorno alla cloaca per ridurre il rischio di recidive. L'applicazione della sutura deve tener conto delle funzioni di urinazione e defecazione: bisogna avere l'accortezza di non occludere completamente la cloaca ma permettere il regolare transito delle escrezioni. La sutura deve essere mantenuta in genere per almeno tre/ quattro settimane. Per migliorare la prognosi ed evitare recidive devono essere corrette tutte quelle situazioni che hanno predisposto e portato al prolasso. Vanno rivisti tutti i parametri ambientali e la razione alimentare. L'eccessiva libidine sessuale viene sanata attraverso la correzione del fotoperiodo e della temperatura ambientale¹⁰⁰.

Nel caso in cui non si sia potuto intervenire celermente e l'organo sia andato incontro a infezione e congestione venosa prolungata con conseguente necrosi, l'unica soluzione è l'amputazione chirurgica.

Il pene e gli emipeni sono gli organi che più facilmente vanno in necrosi dopo il prolasso; l'amputazione è ben tollerata dagli animali e l'urinazione non è compromessa.

Durante l'intervento, il pene o gli emipeni prollassati vengono estesi sino a mostrare la porzione di tessuto ancora sano. Viene in seguito applicata una sutura che assicuri l'emostasi nella porzione prossimale del tessuto sano e si procede alla rimozione dell'area distale alla sutura.

Nel caso di prolasso parziale dell'ovidutto, i tessuti possono essere così tumefatti da non poter più passare per la cloaca. In questi casi potrebbe essere necessario intervenire o con un aproproccio intracelomatico o con una salpingopessi oppure con una

ovariosalpingectomia. Raramente l'intero tratto tubulare dell'apparato riproduttore prolassa ma la gravità della patologia può aumentare in seguito al trascinamento degli organi sul substrato della gabbia o del terrario. L'unico trattamento ragionevole in questi casi è l'ovarioisterctomia totale. Il chirurgo deve rivolgere particolare attenzione sia nel rimuovere tutti i tessuti ovarici sia nel separarli diligentemente dalle porzioni tubulari del tratto riproduttivo. La dissezione del mesovario e del legamento largo faciliteranno notevolmente l'asportazione di ciascun ovaio. Se parte del tessuto ovarico dovesse rimanere in situ, quasi certamente produrrà tuorlo in cavità celomatica con conseguente celomite¹⁰¹.

5.5 Anomalie del prodotto del concepimento

Il prodotto del concepimento può essere esposto ad agenti dannosi durante il periodo embrionale o quello dello sviluppo fetale. La sensibilità e le conseguenze variano nei diversi stadi dello sviluppo. Tra le malformazioni più frequentemente riscontrate nei rettili ritroviamo i mostri doppi, le anomalie del carapace dei cheloni, le anomalie del tegumento, la displasia dell'apparato ioideo, le esostosi osteocartilaginee e le anomalie dell'apparato oculare. Il periodo embrionale è quello di massima sensibilità agli agenti teratogeni: è questo il periodo in cui si formano i foglietti embrionali primitivi e gli abbozzi degli organi⁵⁴. Un agente esterno è denominato teratogeno se può indurre o aumentare l'incidenza delle deformazioni del prodotto del concepimento durante l'organogenesi. Nel caso le deformazioni siano indotte da agenti esterni, questi vengono denominati agenti mutageni e si classificano in: agenti di tipo fisico, biologico, chimico, nutrizionali, autoimmuni o fattori associati all'età materna. Gli agenti teratogeni possono colpire direttamente l'embrione o raggiungerlo tramite modificazioni della madre o della placenta¹⁰². In uno studio eseguito presso la sezione di Clinica Ostetrica dell'Università di Parma sono state documentate alcune

anomalie del prodotto del concepimento. Cinque coppie di *Pogona vitticeps* sono state allevate dall'anno 2001 all'anno 2003. Le coppie erano formate da animali nati in cattività mantenuti in terrari di dimensioni idonee con lampada a raggi UVB ed un faro a luce bianca da 100 watt in modo che un quarto del terrario raggiungesse di giorno una temperatura di 40 °C. Per un idoneo mantenimento degli animali è stato necessario mantenere una temperatura di 40 °C per tre ore al giorno e una temperatura variabile tra i 28 e i 25 °C per il resto del tempo. Gli animali si sono riprodotti nei tre anni dello studio. Nell'anno 2003 le uova deposte dalle copie erano in totale 62 di cui solo 30 embrionate. Durante quello stesso anno le temperature del periodo estivo erano state certamente anomale e le femmine sono state esposte a temperature comprese tra i 32 e i 35°C di giorno e tra i 28 e i 30°C la notte durante tutto la stagione riproduttiva. La temperatura di incubazione delle uova era di 34°C per trenta giorni mentre è scesa a 30°C per i 25 giorni successivi fino alla schiusa delle uova. Per evitare che parassiti infestassero le incubatrici sono stati utilizzati prodotti a base di organofosfati per tutto il periodo dell'incubazione. Dopo la schiusa un feto presentava un'ampia fessurazione ventrale che interessava la cavità celomatica per tutta la sua lunghezza con spostamento verso l'esterno di tutti i visceri e gli organi. Il peritoneo si presentava esposto verso l'esterno mentre il rivestimento tegumentario (squame) costituiva la parte interna. La colonna vertebrale era incurvata a V con un angolo molto acuto in modo tale che le vertebre cervicali e quelle coccigee venissero a contatto tra loro. In prossimità del collo la colonna vertebrale presentava una deviazione laterale sinistra e verso il basso terminando dalla parte opposta in prossimità delle narici. Gli arti posteriori erano situati dorsalmente, rovesciati rispetto alla loro posizione normale e quasi sovrapposti agli arti anteriori.

Durante l'incubazione sono numerosi i fattori che possono intervenire a discapito di un normale sviluppo ma la fase di maggior sensibilità è quella embrionale. In natura i rettili regolano la propria temperatura spostandosi da luoghi caldi a luoghi più freschi secondo le proprie esigenze, mentre in cattività spesso subiscono sbalzi termici determinati dalla cattiva gestione del terrario in cui sono stabulati. L'allevamento dei rettili in cattività in zone in cui il clima è riprodotto artificialmente aumenta le probabilità che gli embrioni o i feti siano esposti a temperature ed umidità non fisiologiche per il loro corretto sviluppo oppure che vengano in contatto con sostanze tossiche. La mostruosità osservata nel caso sopra riportato ha tutte le caratteristiche dello *Schistosoma reflexus* (Fig.19), sindrome di notevole interesse veterinario dal momento che è frequente nei bovini, raro negli equini, sporadico in ovini e maiali e del tutto assente nei cani. Tale morbo è determinato da un agente esogeno che interviene durante il differenziamento dei foglietti embrionali durante la formazione dell'ombelico e quindi della parete addominale. Possiamo pertanto presumere che la nascita di un animale teratogeno possa essere stata causata sia dall'utilizzo dei pesticidi durante l'incubazione, sia all'esposizione delle femmine durante la fase embrionale a temperature troppo elevate. In conclusione possiamo quindi affermare che pur trattandosi di un unico caso gli allevatori di rettili dovrebbero evitare l'uso di agenti chimici durante l'incubazione e controllare in modo molto accurato gli sbalzi termici e l'ipertermia.

Nei rettili come nei mammiferi si possono inoltre verificare casi di embrioni intracelomatici o di morte fetale. Alcuni prodotti del concepimento possono inoltre dare seri problemi in conseguenza della loro decomposizione. Altri feti possono andare incontro a mummificazione rimanendo relativamente inerti. Saltuariamente si possono verificare fenomeni di superovulazione spontanea e avere un numero di uova o feti maggiore rispetto alla norma. Queste situazioni richiedono che la femmina gravida abbia un adeguato supporto

metabolico ed alimentare per favorire il completamento della maturazione del prodotto del concepimento.

Nei rettili sebbene raramente sono stati riportati casi di embrioni gemellari (Fig.20). È possibile che embrioni gemelli completino il loro sviluppo e successivamente emergano dal guscio comune, ma quando condividono il sacco vitellino nello stesso uovo, c'è la possibilità che fendano il guscio ai poli opposti. Quando ciò accade ciascun piccolo cerca di fuoriuscire in direzione opposta all'altro, azione impossibile a causa sia del comune sacco vitellino che del cordone ombelicale⁵⁴. Presto i piccoli saranno esausti ed andranno incontro a morte certa se non sono individuati e separati rapidamente.



Fig.13: esempio di distocia ostruttiva in un esemplare di *Lampropeltis triangulum sinaloe*.



Fig.14: radiografia di una *Testudo graeca*. Si può evidenziare la presenza contemporanea di uova con diverso grado di calcificazione e di alcune uova degenerate.



Fig.15: Trattamento chirurgico della distocia in un esemplare di *Iguana iguana*.



Fig 16: trattamento chirurgico della distocia in un esemplare di *Python regius*.



Fig.17: stasi follicolare in una femmina di *Chamaleo calytratus*. Reperto autoptico.



Fig.18: prolasso del pene in una tartaruga del genere *Pseudemys*.



Fig.19: anomalie del concepimento in un esemplare di *Pogona vitticeps*. Questo caso è riconducibile allo schistosoma reflexum.



Fig.20: schiusa gemellare in un uovo di *Python regius*.

6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Boyer TH, Boyer DM: Turtles tortoises and terrapins. In: Mader DR: Reptile Medicine and Surgery, 2 ed. Pag. 85-86; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006.
- 2) Barten SL: Lizards. In: Mader DR: Reptile Medicine and Surgery, 2 ed. Pag. 64-65; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006.
- 3) Funk RS: Snakes. In: Mader DR: Reptile Medicine and Surgery, 2 ed. Pag. 49-50; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006.
- 4) Lane T: Crocodilians. In: Mader DR: Reptile Medicine and Surgery, 2 ed. Pag. 108-109; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006.
- 5) Giannoukos G, Callard IP: Reptilian (*Chrysemys picta*) hepatic progesterone receptors: Relationship to plasma steroids and the vitellogenic cycle. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 55(1) 93-106, 1995.
- 6) Saint Girons H, Bradshaw SD, Bradshaw FJ: Sexual Activity and Plasma Levels of Sex Steroids in the Aspic Viper (*Vipera aspis*). *General and Comparative Endocrinology*, 91 (3), 287-297, 1993.
- 7) Callard IP, Fileti LA, Perez LE, Sorbera LA, Giannoukos G, Klosterman LL, Tsang P, McCracken JA: Role of the Corpus Luteum and Progesterone in the Evolution of Vertebrate Viviparity. *American Zoologist*, 32 (2) 264-275, 1992.
- 8) Bonnet X, Naulleau G, Mauget R: The Influence of Body Condition on 17- β Estradiol Levels in Relation to Vitellogenesis in Female *Vipera aspis*. *General and Comparative Endocrinology*, 93 (3), 424-437, 1994.
- 9) Guillette Jr. LJ, Gaross TS, Matter JH, Palmer BD: Arginine vasotocin-induced prostaglandin synthesis in vitro by the reproductive tract of the viviparous lizard *Sceloporus jarrovi*. *Prostaglandins*, 39 (1), 39-51, 1990.
- 10) Jones RE, Guillette jr. LJ, Summers CH, Tokarz RR, Crews D: The Relationship Among Ovarian Condition, Steroid Hormones, and Estrous Behavior in *Anolis carolinensis*. *The Journal of experimental zoology*, 227:145-154, 1983.
- 11) Tokarz RR, Crews D: Effects of Prostaglandins on Sexual Receptivity in the Female Lizard, *Anolis carolinensis*. *Endocrinology*, 109 (2), 451-457, 1981.
- 12) Cree A1, Guillette LJ Jr : Effect of beta-adrenergic stimulation on uterine contraction in response to arginine vasotocin and prostaglandin F2 alpha in the gecko *Hoplodactylus maculatus*. *Biol Reprod*, 44(3): 499-510, 1991.
- 13) Gobbetti A, Zerani M, Di Fiore MM: GnRH and Substance P Regulate Prostaglandins and Sex Steroids from Reptilian (*Podarcis sicula sicula*) Ovarian Follicles and Corpora Lutea. *General and Comparative Endocrinology*, 93 (2): 153-162, 1994.

- 14) Denardo D: Reproductive Biology. In: Mader DR: Reptile Medicine and Surgery, 2 ed. Pag. 376-381; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006
- 15) Blackburn DG: Convergent evolution of viviparity, matrotrophy, and specializations for fetal nutrition in reptiles and other vertebrates, Am Zoo 32:313, 1992.
- 16) Blackburn DG: Evolutionary origins of viviparity in the reptilia. Sauria, Amphibia Reptilia 3:185-205, 1982.
- 17) Derickson WK: Lipid storage and utilization in reptiles, Am Zoo 16:711, 1976.
- 18) Crews D, Moore MC: Psychobiology of reproduction of unisexual whiptail lizards. In Wright JW, Vitt LJ, editors: Biology of whiptail lizards (genus *Cnemidophorus*), Norman, Okla, 1993.
- 19) Schuett GW, Fernandez PJ, Gergits WF, Casna NJ, Chiszar D, Smith HM, et al: Production of offspring in the absence of males: evidence for facultative parthenogenesis in bisexual snakes, Herp Nat His 5:1-10, 1997.
- 20) Porter KR: Herpetology, WB Saunders, Philadelphia, 1972.
- 21) Sinervo B, Licht P: Hormonal and physiological control of clutch size, egg size, and egg shape in side-blotched lizards (*Uta stansburiana*): constraints on the evolution of lizard life histories. J Exp Zoo 257:252, 1991.
- 22) Shine R: Parental care in reptiles. In Gans C, Huey RB, editors: Biology of the Reptilia, vol 16 (ecology B, defense and life history), New York, 1988.
- 23) Price AH: Observations of maternal behavior and neonate aggregation in the western diamondback rattlesnake, *Crotalus atrox* (Crotalidae). Southwest Nat 33(3):370-373, 1988.
- 24) McArthur S: Reproductive physiology. In: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J: Medicine and Surgery of Tortoises and Turte., pg. 69, Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Regno Unito, 2004.
- 25) Frye FL: Biomedical and surgical Aspects of captive reptiles husbandry 2 ed. Krieger Publishing Company, Melbourne, FL, 1991.
- 26) Whittier JM, Tokarz RR. Physiological regulation of sexual behaviour in female reptiles. In: Gans C, Crews D: Biology of the Reptilia, 18 (physiology E). Hormones, brain and behaviour. Chicago: University of Chicago. P.24-9, 1992.
- 27) Moore MC, Lindzey J: The physiological basis of sexual behaviour in male lizards. In Gans C, Crews D: Biology of the Reptilia, 18 (physiology E). Hormones, brain and behaviour. Chicago: University of Chicago. P.70-113, 1992.
- 28) Crews D: Interrelationship among ecological, behavioural, and neuroendocrine processes in the reproductive cycle of *Anolis carolinensis* and other reptiles. Adv Study Behav; 11:1-74, 1980.

- 29) Crews D: Behavioural correlates to gonadal state in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Horm Behav*; 4:307-3013, 1973.
- 30) Noble GK, Greenberg B: Effects of season, castration and crystalline sex hormones upon the urogenital system and sexual behaviour of the lizard *Anolis carolinensis*. I. The adult female. *J Exp Zool*; 88:451-479; 1941.
- 31) Cooper Jr WE, Greenberg N: Reptilian coloration and behaviour. In: Gans C, Crews D: *Biology of Reptilia (18 8physiology E)*. Hormones, Brain and Behaviour. Chicago: University of Chicago press; p.298-422; 1992.
- 32) Maderson PFA: The structure and function of holocrine epidermal glands of in sphaerolodactylid and eublepharid gekkonid lizards. *Copeia* 1972:559-557, 1972.
- 33) Mason RT: Reptilian pheromones. In Gans C, Crews D: *Biology of the Reptilia, 18 (physiology E)*. Hormones, brain, and behaviour. Chicago: University of Chicago press; p.114-228; 1992.
- 34) Alberts AC: Ultraviolet visual sensitivity in desert iguanas: implications for pheromone detection. *Anim Behav*; 38:129-37, 1989.
- 35) Mason RT, Gutzke WHN: Sex recognition in the leopard gecko, *Eublepharis macularium* (Sauria:Gekkonidae): possible mediation by skin-derived semiochemicals. *J chem Ecol*; 16:27-36; 1990.
- 36) Bull CM: Population dynamics and pair fidelity in sleepy lizards. In : Vitt LJ, Pianka ER: *Lizard Ecology. Historical and experimental perspectives*. Princeton (NJ): Princeton University Press; P.159-174; 1994.
- 37) Saint Girons H: Comparative data on lepidosaurian reproduction and some time tables. In: Gans C Billet F: *Biology of Reptilia, 15 (development B)*. New York: John Wiley & Sons; p.35-38; 1985.
- 38) Fox W: Special tubules for sperm storage in female lizards. *Nature*, 198:500-501; 1963.
- 39) Cellular O: Oviductal anatomy and sperm storage structures in lizards. *J Morph* 119:7-19; 1966.
- 40) Cellular O: Delayed fertilization in the lizard *Uta Stansburiana*. *Copeia* 549-52; 1966.
- 41) Saint Girons H: Presence de receptacles seminaux chez les camaleons. *Beaufortia* 9:165-72; 1962.
- 42) Hamlett GWD: Notes on breeding and reproduction in the lizard *Anolis carolinensis*. *Copeia* 759-764; 1952.
- 43) Stamps JA: Eggs retention, rainfall and egg laying in a tropical lizard, *Anolis aeneus*. *Copeia* 759-764; 1976.

- 44) Packard GC, Packard MJ: The physiological ecology of reptilian eggs and embryos. In: Gans C, Huey RB, editors. *Biology of the Reptilia*, 16 (ecology B). Defence and life history. Ann Arbor (MI); Branta books; p.523-605, 1994.
- 45) Goin CJ, Goin OB, Zug GR: *Introduction to herpetology*. San Francisco, WH Freeman; 1978.
- 46) Trauth SE: Testicular cycle and timing of reproductive in the collard lizard (*Crotophytus collaris*) in Arizona. *Herpetologica* 35:184, 1978.
- 47) Yaron Z: Endocrine aspects of gestation in viviparous reptiles. *Gen Comp Endocrinol Suppl* 3:663, 1972.
- 48) Birkhead TR, Moller AP: Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 50: 295–311; 1993.
- 49) Frye FL: Clinical obstetric and gynecologic disorders in reptiles. *Proc. Am. Anim. Hosp. Assn.* 497-499; 1974.
- 50) Bigliardi E, Parmigiani E, Di Ianni F: Applicazione dell'ultrasonografia nello studio dell'apparato genitale dei rettili. *Atti LVI Congresso Nazionale SISVET* pag 127-128; 1993.
- 51) Altland, PD, Highman, B, Wood B: Some effects of x-irradiation on turtles. *J. Exp. Zool.*, 118: 1–19; 1951.
- 52) Brooks GH: Resistance of ground skink *Lygosoma laterale* to gamma Radiation. *Herpetologica* 18: 128-129; 1962.
- 53) Brazaitis P, Watanbe ME: Ultrasound scanning of Siamese Crocodile eggs: Hello, are you in there? *Journal of Herpetology* 17:286–287; 1983.
- 54) Jackson OF: Induced skeletal deformities in reptile embryos due to incubation faults. *Brit. Vet. Zoo Soc. Summary of papers* 14:16 – 17; 1985.
- 55) Millefanti M: *Boa e pitoni*. De Vecchi ed, Milano, Italy,, p.74-75; 2009.
- 56) Rival F: *Geste de Base: Le sexage des repties*. *Le point veterinarie*, p.231-232; 1999.
- 57) Ballard B, Cheek R: *Exotic Animal Medicine for the Veterinary Technician*. Wiley-Blackwell Edition, 2013.
- 58) Dellinger T, von Hegel G: Sex Identification through Cloacal Probing in Juvenile Marine Iguanas (*Amblyrhynchus cristatus*). *Journal of Herpetology* 24 (4) pp. 424-426; 1990.
- 59) Shea G, Reddacliff GL: Ossification in the hemipenes of varanids. *Herpetologica* 20: 575-576; 1968.
- 60) Card W, Kluge KL. Hemipenial skeleton and varanid lizard systematics. *J. Herpetol* 29:275-279; 1995.

- 61) Kuchling G: Endoscopic sex determination in juvenile freshwater turtles, *Erymnochelys madagascariensis*: morphology of gonads and accessory ducts. *Chelonian Conservation and Biology* 5:67–73; 2006.
- 62) Kuchling G, Kitimasak W: Endoscopic sexing of juvenile softshell turtles, *Amyda cartilaginea*. *The Natural History Journal of Chulalongkorn University* 9:91–93; 2009.
- 63) Kuchling G, López FJ: Endoscopic sexing of juvenile captive-bred ploughshare tortoises *Geochelone yniphora* at Ampijoroa, Madagascar. *Dodo* 36:94–95; 2000.
- 64) Hernandez-Divers DJ, Stahl SJ, Farrell R: An endoscopic method for identifying sex of hatchling Chinese box turtles and comparison of general versus local anaesthesia for coelioscopy. *J Am Vet Med Assoc* 234(6):800-804; 2009.
- 65) Chaloupka M, Limpus C: Estimates of sex- and age class–specific survival probabilities for a southern Great Barrier Reef green sea turtle population. *Marine Biology* 146:1251–1261; 2005.
- 66) Mortimer JA, Crain DA: Sex steroid concentrations in immature hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) in the Chagos Archipelago. In: *Ecology of the Chagos Archipelago*, ed. C. R. C. Sheppard & R. D. Seaward: pp 177-183; 1999.
- 67) Owens DW: Hormones in the life history of sea turtles . In Lutz PL, Musick: *The Biology of Sea Turtles*. CRC Press, Boca Raton. Pp. 315-341; 1977.
- 68) Zhong-Rong Xia, Pi-Peng Li, He-Xiang Gu, Jonhatan J. Fong, Er-Mi Zhao: Evaluating Non-invasive Methods of Sex Identification in Green Sea Turtle (*Chelonia mydas*) Hatchlings. *Chelonian Conservation and Biology* 10(1):117-123. 2011.
- 69) Gross TS, Crain DA, Bjorndal KA, Bolten AB, Carthy RR: Identification of sex in hatchling loggerhead turtles (*Caretta caretta*) by analysis of steroid concentrations in chorioallantoic/amniotic fluid. *General and Comparative Endocrinology* 99:204–210; 1995.
- 70) Charnier M: Action de la temperature sur la sex ratio chez l’embryo d’Agama agama (*Agamidae*, Lacertilien). *C R Seane Soc Biol* 160:620-2; 1966.
- 71) Wibbels T, Cowan J, LeBoeuf R: Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Exp. Zool.*, 281: 409–416; 1998.
- 72) Coriat AM, Sharpe PT: Temperature dependent sex determination: Evaluation and hypotheses. *Advances in Genome Biology* 4: 229–248; 1996.
- 73) Viets BE: The effects of incubation temperature on hatchling sex and pigmentation. In: de Vosjoli P, Kligenberg R, Tremper R et al.: *The leopard gecko manual*. Mission Viejo (CA): Advanced Vivarium Systems P. 73-79; 1998.
- 74) Viets BE, Tousignant A, Ewert MA, et al.: Temperature-dependent sex determination in the Leopard Gecko, *Eublepharis Macularis*. *J Exp Zool* 265:679-83; 1993.

- 75) Gnudi G, Volta A, Di Ianni F, Bonazzi M, Manfredi S, Bertoni G: Use of ultrasonography and contrast radiography for snake gender determination. *Vet Radiol Ultrasound*. 50(3):309-11; 2009.
- 76) Di Ianni F, Volta A, Pelizzone I, Manfredi S, Gnudi G, Parmigiani E: Diagnostic sensitivity of ultrasound, radiography and computed tomography for gender determination in four species of lizards. *Vet Radiol Ultrasound* 56(1):40-5; 2015.
- 77) Selleri P, Di Girolamo N, Melidone R: Cystoscopic sex identification of posthatchling chelonians. *J Am Vet Med Assoc*. 15;242(12):1744-50; 2013.
- 78) C. Innis: "Infertility and embryonic death" in "Medicine and Surgery of Tortoises and Turtes", S. McArthur, R. Wilkinson, J. Meyer. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Regno Unito, 2004. pg. 63-68
- 79) Highfield AC: Keeping and breeding tortoises in captivity. R&A Publishing Ltd. Engliand. 1990.
- 80) Deeming DC, Ferguson MWJ: Physiological ffects of incubation temperature on embryonic development in reptiles and birds. *Egg Incubation: Its Effects on Embryonic Development in Birds and Reptiles* (eds D. C. Deeming & M. W. J. Ferguson), pp. 147–171. Cambridge University Press, New York. (1991)
- 81) Kam YC, Lilliwhite HB: Effects of temperature and water on critical oxygen tension of turtle embryos. *Exp. Zool*. 268:1-8; 1994.
- 82) Packard MJ, Phillips JA, Packard GC: Sources of Mineral for Green Iguanas (*Iguana iguana*) Developing in Eggs Exposed to Different Hydric Environments. *Copeia* No. 3 pp. 851-858; 1992.
- 83) Ewert MA: The embryo and its egg: development and natural history. In: Harless, M. and Morlock, H. (Eds.) *Turtles: Perspectives and Research*. New York: John Wiley Sons, pp. 333–413; 1979.
- 84) Denardo D: "Dystocias" in "Reptile Medicine and Surgery", D. R. Mader. Saunders/Elsevier, St. Louise, Missouri, Stati Uniti, 2006
- 85) Grain E Jr, Evans JE Jr: Egg retention in four snakes, *J Am Vet Med Assoc* 185(6):679, 1984.
- 86) Gier PJ, Wallace RL, Ingermann RL: Influence of pregnancy on behavioral thermoregulation in the northern Pacific rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*, *J Exp Biol* 145:465-469, 1989.
- 87) Tu MC, Hutchison VH: Influence of pregnancy on thermoregulation of water snakes (*Nerodia rhombifera*), *J Therm Biol* 19(4):255-259, 1994.
- 88) McArthur S: Dystocia. In *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtes* , S. McArthur, R. Wilkinson, J. Meyer. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Regno Unito, 2004. pg. 316-319

- 89) Lloyd ML: Reptilian dystocias review: causes, prevention, management and comments on the synthetic hormone vasotocin, Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians 1990.
- 90) LaPointe J: Comparative physiology of neurohypophyseal hormone action on the vertebrate oviduct-uterus, Am Zool 17:763-773, 1977.
- 91) Di Ianni F, Parmigiani E, Pelizzone I, Bresciani C, Gnudi G, Volta A, Manfredi S, Bigliardi E: Comparison Between Intramuscular and Intravenous Administration of Oxytocin in Captive-Bred Red-Eared Sliders (*Trachemys scripta elegans*) with Nonobstructive Egg Retention. Journal of Exotic Pet Medicine 3(1): 79-84; 2014.
- 92) Frye FL, Schuchman SM: Salpingotomy and cesarian delivery of impacted ova in a tortoise, Vet Med Sm Anim Clin 69(4): 454, 1974
- 93) Thomas HL, Willer CJ, Wosar MA, Spaulding KA, Lewbart GA: Egg-retention in the urinary bladder of a Florida Cooter turtle, *Pseudemys floridana floridana*, J Herpetol Med Surg 12(1):4-6, 2002.
- 94) Peters AR, Coote J: Dystocia in a snake, Vet Rec 100(20):423, 1977.
- 95) Rosskopf WJ Jr, Woerpel R: Treatment of an egg-bound turtle, Mod Vet Prac August:644, 1982.
- 96) McArthur: Follicular stasis in Medicine and Surgery of Tortoises and Turtes, S. McArthur, R. Wilkinson, J. Meyer. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, Regno Unito. pg. 325-329; 2004.
- 97) Bennett RA: Uterine prolapse caused by cystic calculus in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*), Orlando, Fla, 1993, Proceedings of the North American Veterinary Conference.
- 98) Rosskoph WJ, Woerpel RW, Pitts BJ: Paraphimosis in a California desert tortoise, Calif Vet 36(1):29, 1982.
- 99) Frye FL: Clinical obstetric and gynecological disorders in reptiles, Proc AAHA 41:497, 1974.
- 100) Bodri MS, Sadanaga KK: Circumcostal cloacapexy in a python, JAVMA 198:297, 1991.
- 101) Bennet RA, Mader DM: Cloacal Prolapse. In: Mader DR: Reptile Medicine and Surgery, 2 ed; Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, 2006
- 102) Di ianni F, Parmigiani E, Bigliardi E, Vitellozzo G, Corradi A: Un caso di skistosoma reflexus in un sauro della specie *Pogona Vitticeps*. Il congresso nazionale SIRA: 144-146; 2004.