



# UNIVERSITÀ DI PARMA

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICO-VETERINARIE**

*Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria*

**VALUTAZIONE NON INVASIVA DEL BENESSERE E DEI PARAMETRI  
RIPRODUTTIVI NEI FELINI DA ZOO**

**NON INVASIVE EVALUATION OF WELL-BEING AND REPRODUCTIVE  
PARAMETERS IN ZOO FELINES**

**Relatore:**

*Prof. Francesco DI IANNI*

**Laureando:**

Margherita FERRARI

**ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022**



## RIASSUNTO

Tutte le specie selvatiche di felini sono considerate a rischio di estinzione in almeno una parte del loro habitat. Per garantirne la sopravvivenza è essenziale mantenere delle popolazioni sane nelle strutture zoologiche, attraverso programmi di riproduzione in cattività. Lo scopo di questa tesi è capire come assicurare a questi animali un elevato livello di benessere in cattività, finalizzato al loro successo riproduttivo, attraverso l'analisi dei metaboliti ormonali presenti nelle feci. Gli ormoni valutati sono glucocorticoidi, estrogeni e progesterone, in cinque specie che rappresentano l'ampia varietà di strategie riproduttive presenti all'interno della famiglia dei felidi: leopardo delle nevi, ghepardo, lince iberica, gatto pescatore e tigre.

## ABSTRACT

All the wild felid species are considered risking extinction in at least one part of their habitat. In order to guarantee their conservation, it is necessary to maintain populations in zoos healthy through captive reproduction programmes. The aim of this thesis is to understand how to ensure ex situ feline populations a high level of welfare, thus achieving reproductive success, through the analysis of fecal hormone metabolites. Glucocorticoids, estrogens and progesterone have been evaluated in five species that represent a variety of reproductive strategies among the felidae family: snow leopard, cheetah, iberian lynx, fishing cat and tiger.

# Indice

Introduzione .....	6
1. Normativa europea sulla conservazione dei felini .....	7
1.1 CITES .....	7
1.1.1 Appendice I .....	7
1.1.2 Appendice II .....	9
1.1.3 Appendice III .....	9
1.2 Normativa italiana .....	11
1.3 Progetti LIFE.....	12
1.3.1 Progetto LIFE Lynx Connect 2020-2025 .....	13
2. Fisiologia del cortisolo .....	14
2.1 Sintesi ed asse ipotalamo ipofisario .....	14
2.2 Metabolismo ed escrezione .....	16
2.3 Fisiologia dello stress.....	17
2.3.1 Fonti di stress in cattività.....	19
3. Fisiologia degli steroidi sessuali .....	20
3.1 Asse ipotalamo-ipofisario .....	20
3.2 Ciclo estrale nei felini.....	21
3.3 Steroidogenesi gonadale .....	22

3.4 Metabolismo ed escrezione .....	24
4. Misurazione dei metaboliti fecali .....	25
4.1 Raccolta campioni .....	25
4.2 Estrazione .....	26
4.3 Metodi di analisi .....	27
4.3.1 Test immunologici.....	27
4.3.2 Validazione dei metodi di analisi .....	29
5. Analisi: Leopardo delle nevi.....	32
5.1 Riproduzione e ciclo estrale .....	32
5.2 Gestione e accasamento in cattività.....	33
5.3 Metaboliti fecali dei glucocorticoidi.....	33
5.4 Metaboliti fecali degli steroidi sessuali.....	34
6. Analisi: Ghepardo .....	36
6.1 Riproduzione e ciclo estrale .....	36
6.2 Metaboliti fecali dei glucocorticoidi.....	36
6.3 Metaboliti fecali degli steroidi sessuali.....	37
6.3.1 Successo riproduttivo in cattività .....	38
7. Analisi: Lince iberica .....	40
7.1 Riproduzione e ciclo estrale .....	40

7.2 Metaboliti dei glucocorticoidi .....	41
7.3 Metaboliti degli steroidi sessuali .....	42
8. Analisi: Gatto pescatore.....	44
8.1 Riproduzione e ciclo estrale .....	44
8.2 Metaboliti del cortisolo .....	45
8.3 Metaboliti degli steroidi sessuali .....	46
9. Analisi: Tigre.....	48
9.1 Riproduzione e ciclo estrale .....	48
9.2 Gestione ed accasamento in cattività .....	49
9.3 Metaboliti dei glucocorticoidi .....	49
9.4 Metaboliti degli steroidi sessuali .....	51
Conclusione .....	52
Bibliografia .....	53

## Introduzione

In questo momento storico tutte le 38 specie di felidi, escluso il gatto domestico, sono minacciate dall'attività umana e vengono considerate in pericolo di estinzione in almeno una parte del loro habitat naturale (Brown, Wasser, & Graham, Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces, 1994). Il problema principale, oltre al traffico illecito di fauna selvatica, è rappresentato dalla perdita o dalla frammentazione dell'habitat, che impedisce agli animali di spostarsi per cacciare e riprodursi. Più il declino è rapido, più è difficile che la specie riesca a riprendersi per conto proprio. Risulta dunque necessario far riprodurre in cattività le specie in pericolo, in particolare se la loro sopravvivenza si basa sull'intervento umano attraverso programmi di riproduzione negli zoo. Lo scopo finale sarebbe la reintroduzione in natura, in modo da sostenere i numeri delle popolazioni selvatiche, contribuendo a mantenere la loro diversità genetica (Hutchins et al., 2003). Purtroppo, la maggior parte dei felidi in cattività si riproduce con molteplici difficoltà imputate a incompatibilità comportamentale, perdita di variabilità genetica, cure materne inappropriate e stress (Brown, Wasser, & Graham, Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces, 1994). Conoscere la fisiologia degli animali in cattività e comprendere come questa venga alterata dallo stress è cruciale per la salute delle popolazioni di felini da zoo (Parnell T. , et al., 2014). Per valutare lo stato di stress influenzando il meno possibile la salute degli animali è necessario scegliere un metodo non invasivo, rappresentato dall'analisi dei metaboliti fecali del cortisolo. Dalle feci è inoltre possibile analizzare i metaboliti degli steroidi sessuali, in quanto il monitoraggio ormonale è cruciale per garantire il successo dei programmi di riproduzione in cattività.

# 1. Normativa europea sulla conservazione dei felini

Essendo a rischio di estinzione 6 delle 7 specie di grandi felini (leone, tigre, leopardo, giaguaro, ghepardo e leopardo delle nevi, mentre il puma è stato inserito dall'Unione Internazionale per la Conservazione della Natura - IUCN nella categoria definita di "minor preoccupazione") e 12 delle 31 specie di piccoli felini, la Comunità Europea ha approvato una serie di norme intese a limitare il traffico illegale di felini selvatici (IUCN Red List, s.d.).

## 1.1 CITES

La CITES (Convention on International Trade of Endangered Species) è una convenzione sul commercio internazionale delle specie minacciate di estinzione, firmata a Washington nel 1973 ed entrata in vigore nel 1975, a cui aderiscono attualmente 183 Membri (Parties), compresa l'Unione Europea, che ne è diventata Parte dall'8 luglio 2015. CITES ha lo scopo di proteggere piante ed animali a rischio estinzione, regolando e monitorando il loro commercio, ovvero l'esportazione, la riesportazione e l'importazione di animali vivi e morti, piante, nonché loro parti e derivati. CITES regola il commercio internazionale di circa 35'000 specie, raccolte in tre appendici secondo il grado di protezione che esse necessitano, e rientrano nella convenzione non solo esemplari di origine selvatica, ma anche esemplari nati e allevati in cattività, come appunto gli animali da zoo.

### 1.1.1 Appendice I

Comprende le specie più minacciate di estinzione e ne proibisce il commercio di esemplari, eccetto che per ragioni non commerciali



come, ad esempio, la ricerca scientifica. In questi casi eccezionali, il commercio può essere autorizzato con la concessione di un permesso di importazione e di un permesso di esportazione (o certificato di riesportazione). Per quanto riguarda i felidi, sono incluse in quest'appendice le seguenti specie:

- *Acinonyx jubatus* (escluso quote annuali di esportazione per gli esemplari vivi e i trofei di caccia, in totale 205 esemplari)
- *Caracal caracal* (solo le popolazioni asiatiche; tutte le altre popolazioni sono incluse nell'Appendice II)
- *Catopuma temminckii*
- *Felis nigripes*
- *Herpailurus yagouaroundi* (solo le popolazioni di Centro e Nord America; tutte le altre popolazioni sono incluse nell'Appendice II)
- *Leopardus geoffroyi*; *L. guttulus*; *L. jacobita*; *L. pardalis*; *L. tigrinus*; *L. wiedii*
- *Lynx pardinus*
- *Neofelis nebulosa*; *N. diardi*
- *Panthera leo* (solo le popolazioni dell'India; tutte le altre popolazioni sono incluse nell'Appendice II); *P. onca*; *P. pardus*; *P. tigris*; *P. uncia*
- *Pardofelis marmorata*
- *Prionailurus bengalensis bengalensis* (solo le popolazioni di Bangladesh, India e Thailandia; tutte le altre popolazioni sono incluse nell'Appendice II)
- *Prionailurus planiceps*
- *Prionailurus rubiginosus* (solo le popolazioni dell'India; tutte le altre popolazioni sono incluse nell'Appendice II)
- *Puma concolor* (solo le popolazioni di Costa Rica e Panama; tutte le altre popolazioni sono incluse nell'Appendice II) (CITES, s.d.)

### 1.1.2 Appendice II

Comprende specie che al momento non sono necessariamente minacciate di estinzione, ma che potrebbero diventarlo se il loro commercio non venisse strettamente regolato. Il commercio è autorizzato con la concessione del solo permesso di esportazione, o certificato di ri-esportazione (il permesso di importazione non è richiesto). Appartengono a questa appendice tutte le specie di felidi, tranne quelle elencate nell'Appendice I (CITES, s.d.).

### 1.1.3 Appendice III

Comprende specie il cui commercio è già regolato da una Parte, la quale però richiede la cooperazione di altri stati per prevenirne lo sfruttamento eccessivo o illegale. Il commercio di queste specie è consentito solo tramite presentazione degli appropriati permessi o certificati (CITES, s.d.). Non sono soggetti ai provvedimenti CITES i felidi domestici (gatti), considerati tassonomicamente sottospecie di *Felis silvestris* (CITES, s.d.).

Oltre alle tre appendici è importante citare l'Art. VII della convenzione riguardante eccezioni e altri provvedimenti speciali concernenti il commercio. Secondo questo articolo le specie incluse nell'Appendice I riprodotte in cattività per scopi commerciali vengono ritenute come specie incluse nell'Appendice II (e.g. felini allevati in un circo allo scopo di essere venduti ad altri circhi o zoo, sono considerati come appartenenti all'Appendice II), come anche esemplari appartenenti a privati, esemplari destinati alla ricerca scientifica, esemplari acquisiti prima che i provvedimenti CITES venissero messi in atto, animali che sono parte di collezioni o esibizioni itineranti (CITES commercio internazionale fauna e flora, s.d.) (CITES, s.d.).

La CITES è stata recepita in tutta l'Unione Europea mediante regolamenti direttamente applicabili agli Stati membri; i regolamenti attualmente in vigore sono:

- Regolamento (CE) n. 338/97 del Consiglio, del 9 dicembre 1996, relativo alla protezione di specie della flora e fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio, inclusi gli Allegati di tale regolamento contenenti un elenco di specie soggette a commercio disciplinato;
- Regolamento di attuazione (CE) n. 865/2006 della Commissione, del 4 maggio 2006, recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 338/97 del Consiglio relativo alla protezione di specie della flora e fauna selvatiche mediante il controllo del loro commercio;
- Regolamento di esecuzione (UE) n. 792/2012 della Commissione del 23 agosto 2012 che stabilisce norme sulla struttura delle licenze, dei certificati e degli altri documenti previsti dal Reg. (CE) 338/97 e che modifica il Reg. (CE) n. 865/2006;
- Regolamento di esecuzione (UE) n. 1587/2019 della Commissione del 24 settembre 2019 che vieta l'introduzione nell'Unione di esemplari di talune specie di flora e fauna selvatiche.

Tali regolamenti comunitari prevedono quattro Allegati (A, B, C e D); gli Allegati A, B e C corrispondono in linea di massima alle Appendici I, II e III della CITES, ma contengono anche alcune specie non elencate dalla CITES, protette dalla legislazione interna dell'UE. L'Allegato D, per il quale non esiste un equivalente nella CITES, include alcune specie non elencate negli allegati da A a C, ma per le quali l'importanza del volume delle importazioni comunitarie giustifica una vigilanza; tuttavia, esso non comprende alcuna specie felina. Per conformarsi agli altri strumenti dell'UE sulla protezione delle specie native, come la

Direttiva Habitat 92/43/CE e la Direttiva Uccelli 2009/147/CE alcune specie indigene elencate nelle Appendici II e III della CITES sono incluse nell'Allegato A. Per i felidi questo vale per la lince europea (*Lynx lynx*), il gatto selvatico (*Felis silvestris*) ed il gatto di Iriomote (*Prionailurus bengalensis ssp. iriomotensis*). Gli Stati membri possono adottare misure nazionali più restrittive, ad esempio riguardo alla detenzione o al commercio di specie elencate negli Allegati (CITES - Ministero della Transizione Ecologica, s.d.).

## 1.2 Normativa italiana

L'Italia ha ratificato la Convenzione di Washington con la legge 19 dicembre 1975, n.874 e, ai sensi del D.Lgs. 30 luglio 1999 n. 300, l'Autorità di Gestione principale in Italia è costituita dal Ministero della Transizione ecologica, che ha funzioni di indirizzo politico, amministrativo e di coordinamento. L'Autorità per l'emissione dei certificati è rappresentata dal Ministero delle Politiche Agricole, alimentari e forestali, che si avvale del Comando unità forestali, ambientali e agroalimentari (CUFA) dell'Arma dei Carabinieri. L'Autorità competente al rilascio delle licenze di importazione ed esportazione è il Ministero degli Affari Esteri e della Cooperazione Internazionale. Le attività di controllo del rispetto della Convenzione, dei regolamenti comunitari e della normativa nazionale è affidata al Raggruppamento Carabinieri CITES sul territorio e alla Guardia di Finanza negli spazi doganali (CITES - Ministero della Transizione Ecologica, s.d.).

Sebbene gli Stati membri possano adottare misure nazionali più restrittive, per quanto riguarda i felini, l'Italia ha recepito la CITES in modo lievemente meno restrittivo, infatti alcune specie dell'Appendice I CITES sono incluse nell'Appendice II della legge 874/75, ovvero per il commercio di tali animali non è necessario un permesso di

importazione ma solo un permesso di esportazione o certificato di riesportazione. È il caso di *Caracal caracal* e della tigre dell'Amur (*Panthera tigris altaica*), sottospecie di *P. tigris*. Altre specie di felidi citate nelle Appendici CITES non compaiono nella legge italiana perché ancora non identificate tassonomicamente nel momento in cui la legge fu varata (e.g. *Caracal aurata*, *Neofelis diardi*) (Gazzetta Ufficiale, s.d.).

La normativa italiana di riferimento comprende anche la legge n.150 del 7/2/1992, che disciplina i reati relativi all'applicazione in Italia della Convenzione di Washington, ed il Decreto del Ministero dell'Ambiente del 19/4/1996, che elenca le specie animali che possono costituire pericolo per la salute e l'incolumità pubblica e di cui è proibita la detenzione, e di questo fanno parte tutti i felidi. Le violazioni alle disposizioni dei Regolamenti comunitari CITES sono punite con le sanzioni previste dalla suddetta legislazione nazionale, che vanno dall'ammenda all'arresto, e comportano il sequestro e la confisca degli esemplari o dei prodotti CITES (CITES commercio internazionale fauna e flora, s.d.).

### 1.3 Progetti LIFE

I progetti LIFE sono parte di un programma attraverso cui l'Unione europea eroga finanziamenti per progetti di salvaguardia dell'ambiente e della natura. Istituito nel 1992, è uno dei programmi "storici" della Commissione europea, e negli anni ha finanziato 4500 progetti e mobilitato 9 miliardi di euro di investimenti, di cui oltre 4 stanziati dalla Commissione europea a titolo di cofinanziamento. I progetti a tutela della natura intendono migliorare la salvaguardia delle specie e degli habitat a rischio (Direttive Habitat 92/43/CE ed Uccelli 2009/147/CE), con l'obiettivo di arrestare la perdita di biodiversità (LIFE Programs, s.d.). Essendo i Progetti LIFE iniziative dell'Unione europea, ne hanno

beneficiario solo i felini endemici europei, ovvero la lince eurasiatica (*Lynx lynx*) e la lince iberica (*Lynx pardinus*).

### 1.3.1 Progetto LIFE Lynx Connect 2020-2025

Si tratta del programma che dà continuità a LIFE+ Iberlince per il ripristino dell'areale storico della lince iberica in Spagna e Portogallo. Partito in origine nel 2002, quando sopravvivevano meno di un centinaio di linci, nel 2010 ha permesso la reintroduzione di 176 linci in habitat accuratamente selezionati, con un tasso di sopravvivenza del 60%. Quando nel 2012 la popolazione è salita a 313 individui, la IUCN ha promosso la lince iberica da specie in pericolo critico a specie in pericolo (Dell'Amore, Febbraio 2017). È dunque stata fondamentale la riproduzione in cattività delle linci, sia in modo naturale sia tramite inseminazione artificiale. E per ottenere in cattività esemplari fisiologicamente e psicologicamente sani occorre conoscere la fisiologia riproduttiva della specie, promuovere comportamenti naturali ed allestire un ambiente libero da stress (Vargas, et al., 2007). Sorprendentemente si è scoperto che le linci hanno una flessibilità ecologica elevata, il che permette loro di sopportare un moderato stress antropico, e quindi sopravvivere anche in aree di macchia mediterranea attigue ad arterie stradali trafficate (Dell'Amore, Febbraio 2017). La capacità di adattamento ha permesso alla specie di essere reintrodotta con successo in Portogallo, stato in cui si era estinta localmente, ampliando così il proprio areale (Pribbenow, et al., 2014).

## 2. Fisiologia del cortisolo

### 2.1 Sintesi ed asse ipotalamo ipofisario

Il cortisolo è un ormone steroideo sintetizzato dalla corticale della ghiandola surrenale, in seguito a stimolazione da parte dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH). La corticale del surrene è divisa in tre zone: la zona glomerulare più esterna, responsabile della produzione di mineralcorticoidi, la zona fascicolata o intermedia, che secerne i glucocorticoidi, e la zona reticolare più interna, che produce gli ormoni sessuali. Il cortisolo è l'ormone glucocorticoide biologicamente più attivo nella maggior parte dei mammiferi, tra cui i felini (Robson, Taboda , & Wolfsheimer, 1998).

Tutti gli ormoni steroidei, compreso il cortisolo, sono sintetizzati a partire dalla molecola del colesterolo. Questo precursore comune viene trasformato in un primo intermedio che manca della catena laterale, il pregnenolone, dall'enzima CYP11A1. Seguendo la linea di produzione dei glucocorticoidi, il pregnenolone viene convertito dagli enzimi HSD3B2 e CYP17A1 in 17 $\alpha$ -idrossiprogesterone (17OHP), a sua volta convertito in 11-desossicortisolo dal CYP21A2, passaggio obbligatorio nella produzione di glucocorticoidi. Infine, nei mitocondri delle cellule della zona fascicolata del surrene, CYP11B1 converte l'11-desossicortisolo in cortisolo (Schiffer, et al., 2019) (Figura 1).

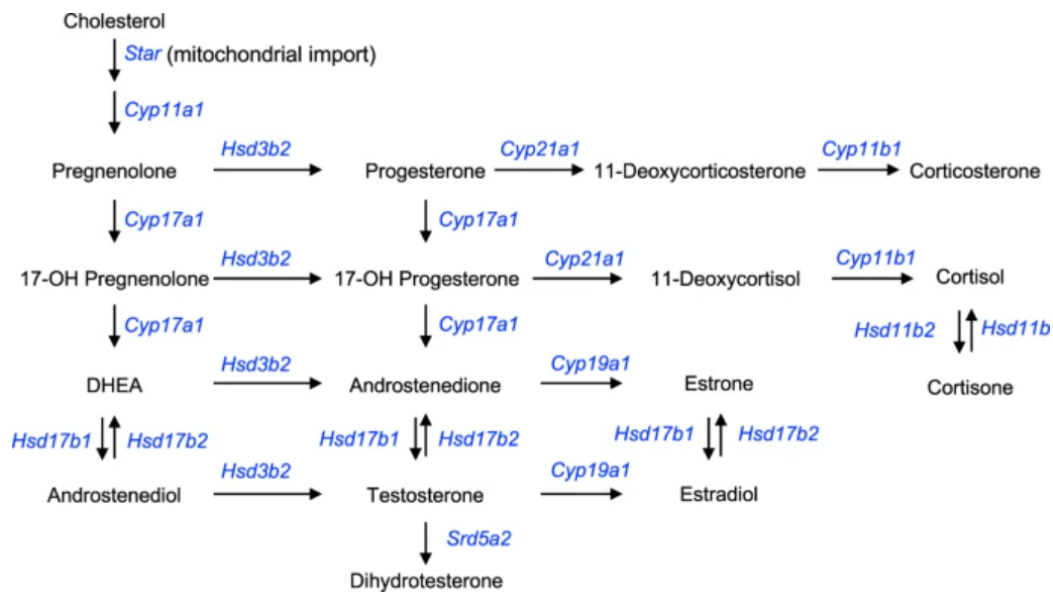


Figura 1 (Chakraborty, Pramanik, & Mahata, 2021)

La secrezione del cortisolo è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che collega ipotalamo, ipofisi anteriore (adenoipofisi) e la ghiandola endocrina periferica che, in questo caso, è il surrene (ghiandola adrenale). L'ipotalamo controlla la sintesi e la secrezione degli ormoni ipofisari attraverso il rilascio dei neurormoni ipotalamici. Essi trasmettono all'ipofisi anteriore informazioni dal sistema nervoso centrale, e, in base a quelle informazioni, sono in grado di stimolare o inibire la secrezione degli ormoni ipofisari. L'ipofisi anteriore, a sua volta, regola la produzione e il rilascio di ormoni dalle ghiandole endocrine periferiche, ormoni che raggiungono infine il circolo sanguigno, da dove esercitano un feedback ad ansa lunga sulle cellule neuroendocrine dell'ipotalamo e sulle cellule endocrine dell'ipofisi anteriore. Anche gli ormoni ipofisari possono esercitare un feedback ad ansa corta sull'ipotalamo. Per arrivare dunque alla secrezione di cortisolo si hanno i seguenti passaggi: l'ipotalamo rilascia l'ormone rilasciante l'ACTH (ACTHRH), che stimola l'ipofisi anteriore a rilasciare l'ACTH, che infine stimola il rilascio di cortisolo o, più in generale, glucocorticoidi da parte della ghiandola surrenale.



## 2.2 Metabolismo ed escrezione

Il cortisolo plasmatico è legato per l'80-90% alla propria proteina trasportatrice, la transcortina, chiamata anche globulina legante i corticosteroidi (corticosteroid-binding globulin CBG), mentre il restante 5-10% è legato all'albumina oppure circola in forma libera e quindi biologicamente attiva. In seguito alla produzione di cortisolo, i tessuti dell'organismo hanno la possibilità di mantenerlo tale o di convertirlo in cortisone, biologicamente inattivo, attraverso l'enzima 11-beta-idrossisteroidedeidrogenasi (11bHSD). I glucocorticoidi sono metabolizzati primariamente dal fegato, anche se altri organi contribuiscono al processo, soprattutto i tessuti periferici. A livello epatico viene metabolizzato in 5-alfa-tetraidro cortisolo (5a-THF) e 5-beta-tetraidro cortisolo (5b-THF), mentre il cortisone è metabolizzato in 5-beta-idrocortisone (5b-THE).

I metaboliti vengono escreti con la bile o con le urine, in gran parte come coniugati. In quanto liposolubili, gli ormoni steroidei possono attraversare facilmente le membrane cellulari per legarsi a recettori intracellulari e quindi al DNA, influenzando la trascrizione genica. Per poter essere escreti efficientemente con urine e bile devono essere convertiti tramite reazioni metaboliche in sostanze idrosolubili. Questo metabolismo si può dividere in due fasi: nella prima, viene alterata l'attività biologica dell'ormone affinché si rivelino gruppi funzionali target per le reazioni chimiche della seconda fase (reazioni di fase I); nella seconda fase avvengono reazioni di coniugazione che aumentano la polarità della molecola e dunque la sua idrosolubilità (reazioni di fase II) (Schiffer, et al., 2019).

Le reazioni di fase II sono la solfatazione e la glucuronazione. La glucuronazione consiste nel coniugare il metabolita con l'acido glucuronico, precedentemente attivato con la formazione di UDP-acido

glucuronico, dando luogo alla formazione di beta-glucuronidi, composti altamente idrofili. L'enzima che catalizza la reazione, l'UDG (UDP-glucuroniltransferasi), è presente soprattutto nel fegato, ma non manca in altri tessuti come rene, intestino, cute e milza. Il metabolita ormonale così coniugato viene facilmente escreto, anche se, una volta rilasciato nell'intestino, può essere idrolizzato dall'enzima beta-glucuronidasi della flora intestinale ed in seguito riassorbito e nuovamente glucuronato, entrando nel circolo enteroepatico (Reazioni di fase II, s.d.) (Palme R. , 2019).

La solfatazione consiste nella coniugazione con un gruppo solfato tramite l'azione degli enzimi solfo-transferasi (SULT), espressi soprattutto nel fegato e in altri tessuti come rene e intestino. Come la glucuronazione, anche la solfatazione rende le molecole più solubili diminuendo la loro penetrazione passiva attraverso le membrane cellulari. I solfati sono escreti principalmente con le urine, quelli escreti con la bile possono essere idrolizzati dalla flora batterica dell'intestino, dando luogo ad un circolo entero-epatico (Reazioni di fase II, s.d.) (Palme R. , 2019).

I glucocorticoidi nei felidi sono escreti per approssimativamente l'85% nelle feci, e vi si ritrovano in seguito a 12-24 ore dalla loro sintesi, lasso di tempo che corrisponde allo svuotamento del tratto intestinale nei carnivori, usando come modello il gatto domestico (Brown, et al., 2001).

## 2.3 Fisiologia dello stress

Lo stress è un'alterata condizione dell'organismo causata da cambiamenti ambientali (stressors), esterni o interni, che sono percepiti come pericoli dal soggetto e ne turbano l'omeostasi. L'organismo si attiva sia dal punto di vista comportamentale che fisiologico, stimolando il

sistema simpatico a produrre catecolamine, e l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, a produrre glucocorticoidi, per riportare l'omeostasi alla normalità. Lo scopo principale dei glucocorticoidi prodotti in risposta agli stressors è mobilitare il glucosio, fornendo energia per rispondere a pressioni ambientali come l'assenza di cibo (Sapolsky, Romero, & Munck, 2000). Esistono tre tipi di stressors in base all'entità della risposta che suscitano nell'organismo: lieve (positiva), moderata (tollerabile), grave (tossica). La risposta lieve si verifica se la situazione di stress è di breve durata e d'intensità lieve/modesta, come l'esposizione temporanea ad un nuovo ambiente o l'introduzione di un nuovo cibo nella dieta. Quando lo stimolo stressante cessa, l'animale ritorna ad uno stato di tranquillità e il quadro endocrino ritorna a livelli basali (eustress). La risposta moderata è scatenata da eventi più gravi in intensità o più lunghi in durata, mentre la risposta grave consegue un evento stressante prolungato e/o molto intenso, che viene percepito come un pericolo maggiore dal soggetto e provoca uno stress cronico, che è tossico per l'organismo (distress) (Buffington & Bain, 2022). In corso di stress cronico i livelli di glucocorticoidi sono costantemente elevati e lo stress cronico può provocare danni alla salute, come ipertensione, ulcere gastrointestinali, squilibri elettrolitici e inibizione della crescita (Breazile, 1987).

Negli animali la secrezione di ACTH, e quindi di cortisolo, segue un ritmo circadiano, sebbene in modo meno pronunciato rispetto all'uomo, con il picco raggiunto tra le 6.00 e le 8.00 del mattino (Sjaastad, Sand, & Hove, 2010). Lo stress altera il rilascio circadiano di cortisolo e, se l'azione stressante diventa prolungata, ne aumenta la concentrazione plasmatica. Se nel gatto l'aumento di cortisolo plasmatico avviene dopo appena 20 minuti in seguito alla manipolazione, una situazione analoga avviene nei felini in cattività, nei quali la secrezione massima di cortisolo è stata osservata tra 30 e 60 minuti dopo l'intervento di contenzione, sebbene ci siano variazioni nell'incremento ormonale tra

le diverse specie e tra i singoli individui (Nogueira & Silva, 1997). Da questo si evince che i felini, sia domestici che selvatici, siano particolarmente suscettibili alle situazioni stressanti, che influenzano perciò il loro benessere nel breve e nel lungo termine.

### 2.3.1 Fonti di stress in cattività

Per tutti i felini in cattività, gli stressors sono diversi da quelli che avrebbero in natura. Come prima cosa, lo stress legato alla necessità di procacciarsi il cibo ed al controllo del territorio vengono a meno, e quindi si crea una finestra temporale che l'animale ha per sé e che in qualche modo deve occupare. Purtroppo il più delle volte si genera ansia e frustrazione, che conducono alla comparsa di stereotipie come movimenti ripetitivi, senza scopo e perpetrati nella stessa area della recinzione. Sono fonte di stress cronico i traumi subiti in giovane età, la competizione con un altro animale considerato come concorrente sul proprio territorio, esposizione al pubblico senza possibilità di nascondersi e malattia cronica (Buffington & Bain, 2022). Fonti di stress acuto sono invece l'anestesia, il contenimento, il trasferimento tra strutture diverse, l'esposizione ad un nuovo ambiente e l'introduzione del partner per l'accoppiamento (Young, et al., 2004). Fondamentale è riuscire a distinguere quali fattori causino stress acuto, destinato a turbare l'omeostasi per breve tempo, e quali causino stress cronico e sarebbero dunque da mitigare tramite pratiche gestionali più appropriate (Tilson, et al., 2016).

## 3. Fisiologia degli steroidi sessuali

### 3.1 Asse ipotalamo-ipofisario

Gli steroidi sessuali sono ormoni steroidei prodotti dalle gonadi, e, in minor quantità, dalla zona reticolare della corteccia surrenalica. La loro produzione dipende dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, per cui il neurormone ipotalamico GnRH stimola l'ipofisi anteriore a produrre l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), i quali stimolano la secrezione degli steroidi sessuali. L'FSH è responsabile della produzione di inibina dai testicoli e di estradiolo dalle ovaie, mentre l'LH permette la sintesi di testosterone dai testicoli e di progesterone dalle ovaie. Gli steroidi sessuali femminili vengono prodotti da due strutture ovariche differenti: gli estrogeni, il cui componente biologicamente più attivo è il  $17\beta$ -estradiolo, sono prodotti dalle cellule della granulosa del follicolo ovarico, mentre il progesterone è sintetizzato dalle cellule del corpo luteo (CL). Nel presente elaborato verranno presi in considerazione tra gli steroidi sessuali solo il progesterone e gli estrogeni perché, per far riprodurre in cattività animali selvatici, è necessario conoscere la fase del ciclo estrale in cui si trova la femmina, e per farlo in modo non invasivo ci si affida alla misurazione dei metaboliti fecali di estrogeni e progesterone.

La secrezione di GnRH nella femmina avviene in due centri ipotalamici. Il centro della secrezione tonica è responsabile della secrezione pulsatile di base del GnRH, ed è indispensabile per mantenere nel tempo una secrezione, anch'essa pulsatile, di FSH ed LH. La secrezione di GnRH è controllata da un meccanismo a feedback negativo, tramite il quale gli ormoni sessuali prodotti dalle gonadi (meccanismo ad ansa lunga) e le gonadotropine ipofisarie (meccanismo ad ansa corta) esercitano un effetto inibitorio sulla secrezione di GnRH. Il centro della secrezione fasica invece libera solo piccole quantità di GnRH, a meno

che non si abbia un elevato aumento dei livelli plasmatici di estrogeni in assenza di progesterone; in tal caso si ha la liberazione di un picco di GnRH che stimola la secrezione del picco di LH, il quale, a sua volta, permette la maturazione finale di uno o più follicoli, e la seguente ovulazione.

### 3.2 Ciclo estrale nei felini

Prendendo come modello il gatto, il ciclo estrale si compone di quattro fasi: proestro, estro, diestro e anestro (Wildt, Brown, & Swanson, *Reproduction in cats*. In: Knobil, E., Neill, J., *Encyclopedia of Reproduction*, 1998). Il proestro dura meno di un giorno ed è associato alla presenza di follicoli ovarici e all'incremento dei livelli di estrogeni nel sangue. L'estro è caratterizzato dall'avanzato sviluppo follicolare e dal picco di concentrazione di estradiolo; è in questa fase che avviene l'accoppiamento, e la femmina mostra comportamenti come vocalizzazioni, lordosi, si rotola e si sfrega contro le superfici (Tilson, et al., 2016) (Brown J. , *Female reproductive cycles of wild female felids*, 2010). È ritenuto che il coito, ripetuto spesso nell'arco di alcuni giorni, sia necessario nella maggior parte dei felidi per stimolare il rilascio di GnRH ed il picco di LH, causando la seguente ovulazione, per questo motivo definita "indotta", ovvero indotta dall'accoppiamento (Johnson & Gay, 1981). Durante il diestro, uno o più corpi lutei producono progesterone, i cui livelli restano elevati per un periodo di tempo variabile: se l'accoppiamento è stato fertile, il progesterone raggiunge concentrazioni elevate per tutta la gravidanza, se non è stato fertile inizia la fase luteale non gravidica, detta anche pseudogravidanza, la cui durata è la metà o due terzi della gravidanza. La fase luteale ha luogo solo se avviene l'ovulazione. L'anestro è il periodo in cui non si ha sviluppo follicolare e gli estrogeni circolanti sono ai minimi livelli (Brown J. , *Female reproductive cycles of wild female felids*, 2010). All'interno del taxon, i felini selvatici presentano

variazioni del ciclo estrale appena descritto proprie delle diverse specie, ad esempio alcune mostrano un'attività ovulatoria sia spontanea che indotta, e verranno analizzate nel Capitolo 4.

### 3.3 Steroidogenesi gonadale

La sintesi degli steroidi sessuali femminili, estrogeni e progesterone, avviene nelle ovaie e nella zona reticolare del surrene. Come per i glucocorticoidi, la molecola precursore è il colesterolo, da cui si ottiene il pregnenolone grazie al CYP11A1. La via metabolica prosegue con la conversione, tramite l'enzima CYP17A1, del pregnenolone in 17 $\alpha$ -idrossipregnenolone, a sua volta trasformato in deidroepiandrosterone (DHEA). Dal DHEA vengono poi prodotti sia i precursori degli androgeni, sia gli androgeni metabolicamente attivi; infatti, grazie agli enzimi HSD17B ed HSD3B2 si arriva alla produzione di testosterone che, nella femmina, avviene nelle cellule della teca. La maggior parte di questo ormone viene poi convertito in 17 $\beta$ -estradiolo dalle cellule della granulosa, tramite l'enzima aromatasi (Schiffer, et al., 2019) (Figura 2). La produzione di androgeni (DHEA e testosterone) nelle cellule della teca è stimolata dall'LH, mentre la loro trasformazione in estrogeni è stimolata dall'FSH. Il progesterone è invece sintetizzato direttamente dal pregnenolone, è dunque prodotto a seguito di una via metabolica più breve. È da notare come, anche partendo dal progesterone, è possibile arrivare alla sintesi di testosterone tramite reazioni catalizzate dal CYP17A1 e dal HSD17B (Figura 2).

## Testicular Leydig cells / Ovarian Theca cells

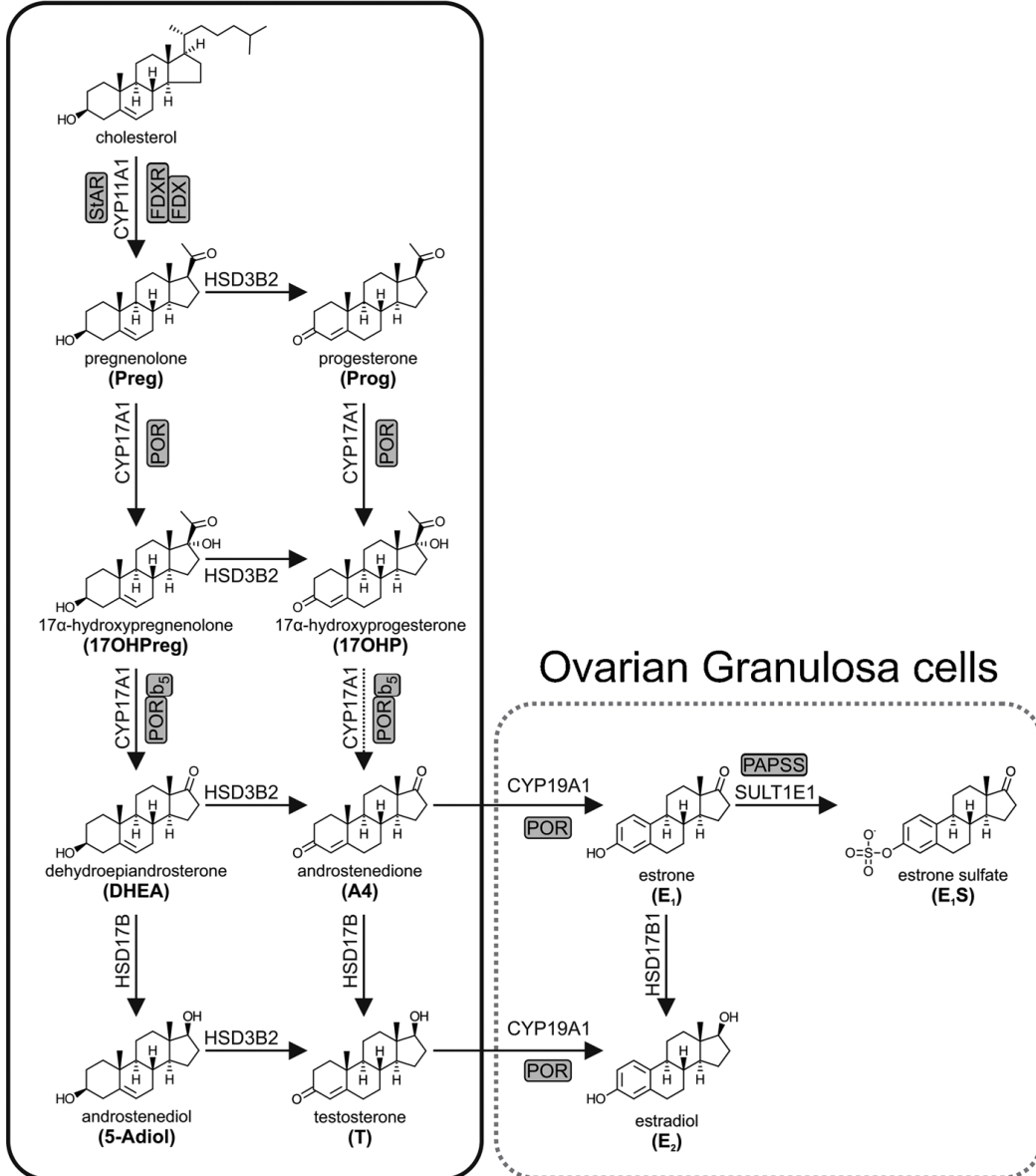


Figura 2 (Schiffer, et al., 2019)



### 3.4 Metabolismo ed escrezione

Come per i glucocorticoidi, anche gli steroidi sessuali vengono trasformati in composti idrosolubili per poter essere escreti più facilmente. Questo metabolismo avviene nel fegato, dove vengono sottoposti a reazioni di fase I, e successivamente a reazioni di fase II come la solfatazione o la glucuronazione (Vedi sopra). Il progesterone circola principalmente legato alla CBG, viene metabolizzato in una prima fase in pregnanediolo, poi subisce la glucuronazione; invece gli estrogeni circolano legati alla globulina legante gli ormoni sessuali (Sex Hormones Binding Globulin – SHBG) con alta affinità ed all'albumina con bassa affinità, subiscono idrossilazioni in fase I e possono essere ugualmente solfatati o glucuronidati in fase II (Schiffer, et al., 2019).

L'escrezione avviene sempre tramite le urine e la bile. Nell'intestino i metaboliti possono essere idrolizzati dalla flora batterica, riassorbiti nel sangue ed entrare nel circolo enteroepatico. Nonostante questo riassorbimento, nei felini si ritrovano nelle feci più dell'85% dei metaboliti degli ormoni steroidei, tra cui gli ormoni sessuali (Terio, Citino, & Brown, 1999). Sembra che gli estrogeni siano sottoposti ad una maggiore escrezione biliare rispetto agli altri steroidi (Schiffer, et al., 2019). Gli estrogeni fecali sono composti principalmente da metaboliti dell'estradiolo, coniugati e non coniugati, con minori quantità di metaboliti di estrone ed estriolo; il progesterone è presente nelle feci tramite suoi composti polari, principalmente coniugati (Brown J. , Female reproductive cycles of wild female felids, 2010).

## 4. Misurazione dei metaboliti fecali

Per ottenere valori che rispecchino il più possibile la reale quantità di metaboliti ormonali presenti nelle feci, occorre conoscere quale metodo funziona meglio per misurare l'ormone ricercato e per la specie animale interessata. Il primo passaggio è la raccolta e la conservazione dei campioni, seguita dall'estrazione dei metaboliti dalle feci e dal test che permette la misurazione della quantità di sostanza estratta.

### 4.1 Raccolta campioni

In base al tipo di studio e al metabolismo della specie interessata, le feci vengono raccolte quotidianamente o più volte a settimana. Se la ricerca è volta a misurare i metaboliti fecali dei glucocorticoidi, sarebbe bene fissare l'ora per il prelievo, in modo da ottenere valori non influenzati dal rilascio circadiano del cortisolo, e quindi eliminare un possibile fattore di confondimento. I campioni sono raccolti per periodi di tempo variabili, ad esempio negli studi longitudinali il campionamento prosegue per alcuni anni. I campioni vengono conservati ad una temperatura che va dai  $-20^{\circ}\text{C}$ , specialmente se si tratta di valutare i metaboliti del cortisolo, ai  $-80^{\circ}\text{C}$  (Terio, Citino, & Brown, 1999) (Kinoshita, et al., 2011). Le condizioni di stoccaggio dei campioni tra la raccolta e il congelamento hanno effetti imprevedibili sulla concentrazione di metaboliti; l'ideale sarebbe congelarli rapidamente appena dopo la defecazione, evitando così che gli enzimi microbici inizino a metabolizzare gli steroidi. Poiché questa precauzione viene messa in atto raramente (Palme R. , 2019), non esiste un protocollo standard per lo stoccaggio delle feci. Un'ulteriore degradazione avviene quando i campioni sono scongelati; per quanto riguarda i metaboliti dei glucocorticoidi, sarebbe meglio che lo scongelamento avvenga ad elevata temperatura e in breve tempo, piuttosto che a temperatura ambiente durante tutta la notte, perché

restano stabili se trattati con il calore (Mostl, Rettenbacher, & Palme, 2005). Nonostante queste precauzioni per preservare la stabilità degli steroidi, restano comunque delle differenze tra specie, tra ormoni steroidei, e tra i metodi di analisi utilizzati sull'estratto fecale. Per questi motivi, è importante utilizzare lo stesso tipo di prelievo, lo stesso procedimento di estrazione e metodo di analisi per i campioni di uno stesso esperimento, per generare dati attendibili (Palme R. , 2019).

## 4.2 Estrazione

I campioni vengono scongelati, omogenati e divisi in aliquote; una sola aliquota viene usata per l'estrazione, ed è quindi sospesa in una soluzione di acqua ed alcol primario, che nella maggior parte dei casi è metanolo all'80% (ad oggi, si è dimostrato il più efficiente per rilevare i metaboliti dei glucocorticoidi), oppure etanolo o propanolo (Palme, Touma, Arias, Dominchin, & Lepschy, 12 Agosto 2013). Nei carnivori, tra cui i felini, è importante utilizzare un'elevata percentuale di alcol (80-90%) perché estrae meglio le molecole polari, come sono appunto i metaboliti coniugati che abbondano nelle feci di questi animali. La quantità di solvente viene aggiunta all'aliquota in proporzione 10:1 o maggiore, ad esempio 1ml di alcol per 0,1g di feci. Avendo le feci elevate concentrazioni di steroidi fecali, i campioni possono essere sottoposti ad ulteriori diluizioni seriali per aumentare la sensibilità del test ed eliminare sostanze che potrebbero dare interferenze. La sospensione viene vortexata per 30 minuti in modo che le particelle di feci si sedimentino sul fondo della provetta e che i metaboliti vengano estratti dal solvente alcolico, restando con esso nel surnatante (Palme, Touma, Arias, Dominchin, & Lepschy, 12 Agosto 2013).

## 4.3 Metodi di analisi

Esistono principalmente due metodi per misurare i metaboliti degli steroidi: metodi cromatografici, usati in combinazione con la spettrometria di massa, e test immunologici (Wudy, Schuler, Sánchez-Guijo, & Hartmann, 2018). Tra i due sono utilizzati quasi esclusivamente gli ultimi, in quanto meno costosi e applicabili su più larga scala (Palme R. , 2019).

### 4.3.1 Test immunologici

I test immunologici si basano sul principio del riconoscimento di un antigene presente nel campione da parte di anticorpi diretti contro di esso. Quelli utilizzati più comunemente sono detti "competitivi": prima vengono incubati gli antigeni marcati assieme all'anticorpo, successivamente sono aggiunti gli antigeni del campione, che in parte spiazzano quelli marcati dai posti di legame dell'anticorpo (Cecchin & Bui). Questa competizione per i siti di legame sugli anticorpi rilascia una quantità di antigene marcato che permette di dedurre la quantità di antigene nel campione (Dosaggio radioimmunologico - RIA, s.d.). In base alla natura del sistema che rileva l'antigene marcato, si distinguono i dosaggi radioimmunologici (RIA - Radio Immuno Assay), e i dosaggi immunoenzimatici (EIA - Enzyme Immuno Assay): nel primo, gli antigeni sono marcati con uno o più atomi di un isotopo radioattivo, in genere con  $C^{14}$  o  $H^3$ , nel secondo sono legati a un enzima, come la fosfatasi alcalina o perossidasi del rafano (Mostl, Rettenbacher, & Palme, 2005) (Vazquez-Pertejo, 2020). Traslando queste nozioni sui metaboliti fecali, gli antigeni da identificare sono i metaboliti degli ormoni steroidei, mentre gli anticorpi sono prodotti di sintesi realizzati da ditte commerciali appositamente per legarsi al metabolita ricercato. Negli ultimi anni i EIA hanno in gran parte

soppiantato i RIA perché richiedono attrezzatura meno cara e non sono necessari laboratori autorizzati per l'utilizzo di sostanze radioattive.

È necessario introdurre il concetto di cross-reattività degli anticorpi: i metaboliti rilevati da un test per la misurazione del corticosterone non è detto che siano metaboliti del corticosterone, perché, siccome i glucocorticoidi sono pesantemente metabolizzati, anche i metaboliti del cortisolo potrebbero mostrare cross-reattività agli anticorpi. Per questo motivo è preferibile ampliare lo spettro d'azione dei test immunologici, utilizzando anticorpi che non si legano a metaboliti di singoli ormoni, come cortisolo o estradiolo, ma che sono gruppo-specifici, cioè rilevano gruppi di metaboliti (es. metaboliti dei glucocorticoidi o degli estrogeni). Così è anche possibile misurare concentrazioni più alte di metaboliti e avere quindi un risultato più significativo.

Bisogna tenere presente che le concentrazioni misurate dipendono fortemente dal metodo usato, è perciò impossibile paragonare concentrazioni assolute tra studi diversi. Non è ugualmente possibile comparare il valore assoluto di un aumento dei metaboliti fecali dopo uno stressor tra specie diverse (Palme R. , 2019).

L'effettivo metodo analitico per il dosaggio immunoenzimatico prevede i seguenti passaggi:

- Allestimento della piastra, in genere di 96 pozzetti, con lo steroide marcato, già pronti all'uso se si usano kit commerciali;
- Aggiunta dell'anticorpo, incubazione e primo lavaggio per eliminare le molecole che non si sono legate;
- Aggiunta degli steroidi del campione dopo estrazione, con seguente competizione per i posti di legame sugli anticorpi, incubazione e secondo lavaggio;

- Esposizione dei pozzetti ad una fonte luminosa che emette luce blu (450nm), collegata ad un computer su cui è installato un software per la lettura dei risultati.

L'unità di misura per esprimere la concentrazione di metaboliti fecali in questo caso è nanogrammi per grammo di feci (ng/g), ma si può esprimere anche in microgrammi ( $\mu\text{g/g}$ ).

#### 4.3.2 Validazione dei metodi di analisi

La validazione dei metodi per l'analisi serve per avere la certezza che la tecnica usata sia davvero in grado di misurare le sostanze ricercate, e che si tratti effettivamente dei metaboliti fecali degli steroidi. La validazione può essere analitica, fisiologica o biologica.

La validazione analitica consiste nel valutare la precisione, la sensibilità e la specificità del test utilizzato, e quindi valutare la sua accuratezza nel complesso. La precisione viene indicata dal coefficiente di variazione, una misura statistica che fornisce informazioni sulla variabilità dei metaboliti fecali rilevati (Pozzolo, 2021). Un test è sensibile quanto più è efficace nel rilevare anche la più piccola dose di metaboliti fecali, ma poiché questi sono presenti in alte concentrazioni, e data anche la cross-reattività degli anticorpi con diversi metaboliti, la sensibilità è generalmente elevata. La specificità è la capacità di un metodo analitico di svelare una determinata sostanza in presenza di altre aventi proprietà molto simili: la specificità è quindi scarsa, soprattutto nel dosaggio immunoenzimatico, perché i metaboliti dei glucocorticoidi sono simili tra loro, così come i metaboliti degli steroidi sessuali, e anche tra queste due categorie ci sono affinità molecolari; oltre a questo, va presa in considerazione la cross-reattività degli anticorpi, in quanto non si può dire con certezza che il metabolita rilevato dal test derivi effettivamente dall'ormone per la ricerca del

quale il test è stato prodotto. Per questo motivo viene data maggiore importanza alla validazione fisiologica e biologica.

La validazione fisiologica induce un cambiamento nella concentrazione di ormone circolante, in genere attraverso una stimolazione farmacologica dell'asse ipotalamo-ipofisario. Per i glucocorticoidi il più utilizzato è il test di stimolazione con ACTH (Palme R. , 2019): all'animale viene somministrato l'ormone adrenocorticotropo, causando il rilascio di glucocorticoidi nel circolo sistemico da parte del surrene. Dopodiché si prelevano i campioni di feci e si utilizza il dosaggio immunoenzimatico che si vuole testare per determinare i metaboliti. Se la quantità rilevata è effettivamente elevata rispetto allo standard di quell'animale, il metodo può ritenersi valido. Per i metaboliti degli steroidi sessuali, è possibile somministrare GnRH, prelevare nei 1-2 giorni successivi le feci degli animali testati, e rilevare un aumento delle concentrazioni di estrogeni e progesterone.

Con le specie a rischio di estinzione, effettuare una validazione fisiologica può essere pericoloso per la salute dell'animale, perciò ha senso eseguire una validazione biologica. Per i metaboliti dei glucocorticoidi, si esegue la misurazione prima, durante, e dopo un evento ritenuto stressante per l'animale (ad esempio lavori in corso vicino alla recinzione, interventi di sedazione etc.), e se la concentrazione aumenta durante e/o dopo lo stressor, è dimostrato che ci sono stati cambiamenti nell'attività surrenalica che il test è riuscito a rilevare, e quindi può considerarsi valido. Per i metaboliti degli steroidi sessuali, ad esempio gli estrogeni, si prelevano campioni di feci prima, durante, e dopo che la femmina mostra un comportamento compatibile con la fase estrale, oppure in seguito all'osservazione dell'avvenuto accoppiamento. Ancora, è possibile validare il test misurando le concentrazioni di progesterone o estrogeni tra maschi e femmine, oppure tra animali giovani e adulti.

Nella validazione fisiologica e biologica bisogna stabilire quale sia il livello base di metaboliti, prima di procedere all'iniezione di ACTH/GnRH o prima che si verifichi l'evento stressante o l'accoppiamento. Si raccolgono i campioni di feci quotidianamente su almeno due animali, facendo attenzione a non causare alcun tipo di disturbo. Una volta calcolate le misurazioni quotidiane dei metaboliti, per evitare i due estremi nei dati collezionati, si esegue la mediana invece della media aritmetica. In ogni caso bisogna sempre tenere a mente che possono esserci variazioni a causa di fattori di confondimento come la stagione, lo stato riproduttivo, la dieta e il sesso dell'animale, oltre che variazioni individuali.

Nonostante la validazione sia uno strumento efficiente per dimostrare l'affidabilità di un metodo di analisi nel contesto di un preciso esperimento, ciò non significa che metodi non validati diano risultati scorretti. Se in uno studio il metodo non è validato, spesso il motivo è da riferire all'utilizzo di un kit commerciale per la misurazione dei metaboliti, diventa quindi responsabilità del produttore dimostrare che il test dia risultati significativi. Ovviamente questi test possono adattarsi più o meno bene al contesto di ogni singolo studio, ed è quindi a discrezione dei ricercatori individuare quale tipo sia più adatto al progetto che andranno a svolgere, oppure se sono in grado di eseguire una validazione, che sia analitica, fisiologica o biologica.



## 5. Analisi: Leopardo delle nevi

### 5.1 Riproduzione e ciclo estrale

Il leopardo delle nevi (*Panthera uncia*) è un felino elusivo e di indole solitaria classificato come "vulnerabile" dalla IUCN, e inserito nell'Appendice I della CITES. Nell'habitat naturale si possono vedere più esemplari adulti assieme solo durante la stagione riproduttiva, che inizia a dicembre-gennaio e termina a marzo-aprile, oppure madri con i cuccioli al seguito. La gravidanza dura 90-100 giorni e i cuccioli (da 1 a 8) rimangono con la madre per 1-2 anni, in modo da trascorrere insieme almeno un inverno (Johansson, et al., 2020). Considerato che la finestra riproduttiva è ristretta e le cure parentali prolungate, le femmine di questa specie si riproducono ogni due anni.

Il ciclo estrale dura da un minimo di 5 ad un massimo di 35 giorni, in media 12-13, ed è definito dal 1° giorno di estro al 1° giorno dell'estro successivo, includendo solo cicli estrali non ovulatori, in quanto l'ovulazione è indotta nel leopardo delle nevi (Kinoshita, et al., 2011). Nei felini con ovulazione indotta il ciclo estrale non può essere definito da una fase estrale seguita da una fase luteinica, poiché non è detto che ci sia l'ovulazione, per la quale è necessaria la presenza del maschio. Per questo motivo si tengono in considerazione solo cicli estrali non ovulatori. Durante la stagione riproduttiva le femmine hanno in media due cicli estrali al mese, la specie è dunque considerata poliestrale stagionale. Nel caso in cui avvenga l'ovulazione, segue la fase luteinica con un aumento dei livelli basali di progesterone, sia che avvenga il concepimento e inizi una gravidanza, sia che la femmina non resti gravida e inizi una pseudogravidanza. L'aumento del progesterone è rispecchiato dall'aumento dei suoi metaboliti nelle feci; tuttavia, l'aumento non è abbastanza pronunciato per riuscire a distinguere una gravidanza da una pseudogravidanza nei primi due

mesi, il che fornirebbe una diagnosi molto tardiva considerato che la gestazione ne dura tre in totale.

## 5.2 Gestione e accasamento in cattività

Negli zoo i leopardi delle nevi sono ospitati in recinti individuali, replicando la condizione in cui si troverebbero in natura, oppure sono tenuti assieme ad altri esemplari, formando coppie dello stesso sesso o di sesso diverso, o piccoli gruppi. Nel primo caso, maschio e femmina sono tenuti in recinti separati durante la stagione non riproduttiva e messi assieme in inverno per consentire l'accoppiamento. Il ruolo e le conseguenze che l'accasamento sociale di specie solitarie provvede negli zoo non sono chiari. Secondo l'Associazione mondiale di zoo e acquari (World Association of Zoos and Aquariums - WAZA), i leopardi delle nevi in cattività possono essere ospitati permanentemente in coppie o anche in piccoli gruppi, se gli animali sono compatibili tra loro (WAZA, 2015). Il più probabile beneficio apportato da questa gestione è la possibilità di trascorrere il tempo con attività quali grooming su altri esemplari ed il gioco, allontanando lo sviluppo di comportamenti stereotipati, dettati principalmente dalla frustrazione e dalla noia (Macri & Patterson-Kane, 2011). Sembrerebbe però che questo tipo di gestione, pur non alterando l'attività ovarica degli esemplari femmina, non favorisca il concepimento (vedi sotto).

## 5.3 Metaboliti fecali dei glucocorticoidi

Nello studio di Kinoshita et al., 2011, la misurazione del cortisolo fecale mostra valori omogenei durante tutto l'anno negli esemplari accasati individualmente (0,1-2 µg/g), mentre nella femmina ospitata col maschio i valori sono altalenanti (0,1-6 µg/g) (Kinoshita, et al., 2011). Sebbene i due riproduttori, pur essendo compatibili tra loro e quindi ospitati insieme, condividono lo stesso territorio; è dunque possibile

che la sua forzata spartizione incrementi i livelli di cortisolo (Kinoshita, et al., 2011) e generi quindi stress cronico, influenzando negativamente l'attività riproduttiva. Considerato che solo le femmine ospitate individualmente siano rimaste gravide, sembra esserci una correlazione, ancora non dimostrata scientificamente, tra il successo riproduttivo e l'accasamento in recinti individuali, che ha come beneficio quello di mantenere bassi i livelli di cortisolo (Kinoshita, et al., 2011).

## 5.4 Metaboliti fecali degli steroidi sessuali

È possibile verificare l'attività ovarica determinando la concentrazione di metaboliti fecali degli estrogeni, mentre monitorando l'aumento dei metaboliti del progesterone è possibile verificare l'avvenuta ovulazione (Reichert-Stewart, Santymire, Armstrong, Harrison, & Herrick, 2014). Lo studio di Kinoshita et al., 2011, ha valutato le variazioni di dei metaboliti fecali del  $17\beta$ -estradiolo, progesterone e cortisolo su tre esemplari femmina nell'arco di più stagioni riproduttive, per capire come queste variazioni possano favorire o meno una gravidanza portata a termine con la nascita di cuccioli sani. In tutti gli esemplari, i picchi di  $17\beta$ -estradiolo (4-18  $\mu\text{g/g}$ , rispetta ai livelli base di 0,5-1  $\mu\text{g/g}$ ), indicanti l'inizio dell'estro, si hanno già a partire da ottobre-novembre. Negli zoo, la stagione riproduttiva potrebbe iniziare prima per due possibili motivi: non è necessario che la femmina trovi un compagno se già ospitata assieme ad esso (Johansson, et al., 2020), oppure, poiché lo stato di cattività elimina lo stress connesso al procacciarsi il cibo, lo stato di nutrizione sempre ottimale permette un inizio precoce dell'attività ovarica. Si potrebbe sfruttare questa precocità per aumentare i tentativi di fecondazione artificiale e unire più volte maschio e femmina nell'arco dell'inverno. In questo modo, se anche dovesse verificarsi una pseudogavidanza, la femmina avrebbe il tempo di tornare in estro prima della fine della stagione riproduttiva.

Inoltre, nella femmina che è stata accasata sia con il maschio, sia individualmente, i picchi di  $17\beta$ -estradiolo sono molto più elevati durante la stagione riproduttiva che segue il periodo trascorso in isolamento (16-18  $\mu\text{g/g}$  vs.  $\approx 6\mu\text{g/g}$ ), suggerendo che questo stimoli l'attività ovarica (Kinoshita, et al., 2011).

L'aumento di almeno sei volte rispetto ai livelli basali (2,5  $\mu\text{g/g}$  in media) dei metaboliti del progesterone ha permesso di individuare con certezza il periodo di gestazione (35-45  $\mu\text{g/g}$ ) e di pseudogavidanza (15-25  $\mu\text{g/g}$ ). La femmina tenuta insieme al maschio ad anni alterni, nonostante gli avvenuti accoppiamenti, non è rimasta gravida in nessuna delle quattro stagioni riproduttive monitorate (Kinoshita, et al., 2011).

## 6. Analisi: Ghepardo

### 6.1 Riproduzione e ciclo estrale

Il ghepardo (*Acinonyx jubatus*) è classificato dalla IUCN come "vulnerabile", contando in natura poco più di 7000 esemplari (Marker, 2002) ed è inserito nell'Appendice I della CITES (CITES commercio internazionale fauna e flora, s.d.). È una specie poliestrale, con un ciclo estrale di circa 10-12 giorni (Kinoshita, Ohazama, Ishida, & Kusunoki, 2011). L'estro corrisponde ad un aumento nella concentrazione dei metaboliti fecali dell'estradiolo (FEM) della durata di circa 4 giorni, associato all'accoppiamento, alla manifestazione di comportamenti estrali, o alla somministrazione di gonadotropina corionica equina (eCG) per la fecondazione artificiale (Brown, et al., 1996). Questo suggerisce che l'ovulazione sia indotta, ed è confermata dal fatto che si ha un aumento dei metaboliti fecali del progesterone (FPM) nelle femmine che si sono accoppiate e sono rimaste gravide, oppure sono andate incontro ad una fase luteale non gravidica (pseudogavidanza) (Brown, et al., 1996) (Kinoshita, Ohazama, Ishida, & Kusunoki, 2011). La durata della gravidanza è di circa 94 giorni, mentre quella della pseudogavidanza è circa la metà; la ciclicità ovarica è interrotta da periodi di anestro, lunghi anche 2-7 mesi, non legati alla stagione climatica e non sincronizzati tra le diverse femmine (Brown, et al., 1996).

### 6.2 Metaboliti fecali dei glucocorticoidi

I ghepardi sono felini molto soggetti allo stress cronico dato dalla cattività e allo stress acuto generato dalla loro manipolazione. La dimensione della corticale adrenale in soggetti in cattività è maggiore rispetto a quella di esemplari in natura, poiché il rilascio costante di ACTH dovuto allo stress, stimola la corticale generando un'iperplasia della zona fascicolata (Terio, Marker, & Munson, 2004). Dallo stesso

studio che ha valutato la morfologia delle ghiandole adrenali, è emerso che i livelli di glucocorticoidi fecali, valutati tramite dosaggio radioimmunologico, sono più elevati in ghepardi in cattività ( $196 \pm 36$  ng/g), sia esposti che non esposti al pubblico, rispetto a quelli in natura ( $34 \pm 12$  ng/g), evidenziando come questi felini, negli zoo, siano sottoposti a stress cronico. Anche procedure più brevi, come visite di routine, sono in grado di generare uno stress acuto; in particolare l'anestesia necessaria per esaminare l'animale determina un rialzo drammatico dei glucocorticoidi rispetto ai livelli basali, del 390% per il cortisolo misurato con dosaggio immunoenzimatico e del 1540% per il corticosterone misurato con dosaggio immunoradiologico (Young, et al., 2004).

### 6.3 Metaboliti fecali degli steroidi sessuali

I profili degli estrogeni e dei progestinici fecali delle femmine di ghepardo sono simili, indifferentemente dalle condizioni in cui sono ospitate (Kinoshita, Ohazama, Ishida, & Kusunoki, 2011). L'estro dura circa 4 giorni ed è individuato dall'aumento nella concentrazione di metaboliti degli estrogeni di 4-12 volte rispetto ai livelli basali (picchi da 100 a 750ng/g, livelli base 25-60ng/g) (Brown, et al., 1996). Inoltre, non c'è differenza nella concentrazione del picco estrale di estradiolo tra femmine che hanno concepito e quelle che, pur accoppiandosi, non sono rimaste gravide (Brown, et al., 1996). Da questi risultati si è portati a pensare che la ridotta fertilità di questi felini potrebbe riflettere pratiche gestionali subottimali, e non un'alterata fisiologia riproduttiva (Wildt, et al., 1993).

I metaboliti del progesterone aumentano in corrispondenza della gestazione e durante la pseudogavidanza anche di 200-400 volte rispetto ai livelli base, arrivando a 200-240 $\mu$ g/g, mentre nelle femmine

che, pur presentando un ciclo estrale regolare, non si sono accoppiate sono decisamente più bassi, tra 0.7 e 6µg/g (Brown, et al., 1996).

### 6.3.1 Successo riproduttivo in cattività

Il motivo per cui il successo riproduttivo del ghepardo in cattività è scarso è da imputare principalmente alla bassa diversità genetica e alla bassa qualità dell'ejaculato (Wildt, et al., 1987). Tuttavia, entrambi questi fattori sono presenti sia nei ghepardi selvatici, sia in quelli in cattività, per cui dev'esserci un'altra ragione che spieghi la fertilità ridotta; e questa potrebbe trovarsi nella gestione dell'animale negli zoo (Caro, 1993) (Wildt, et al., 1993). Questa specie viene ospitata sia dividendo gli animali secondo il sesso, sia unendo maschi e femmine nella stessa recinzione. Nel primo caso, i maschi vengono tenuti in gruppi di 2-3 esemplari, come avverrebbe in natura, dove i maschi adulti vivono in piccole coalizioni; le femmine vengono sia messe in recinti individuali, sia ospitate assieme. Secondo uno studio condotto in Giappone, delle cinque femmine di ghepardo monitorate, solo quella ospitata singolarmente per un lungo periodo di tempo (oltre un anno) è rimasta gravida e ha partorito un cucciolo sano, nonostante tutte e cinque mostrassero profili ormonali simili (Kinoshita, Ohazama, Ishida, & Kusunoki, 2011). Si può supporre che la condivisione della stessa area, e dunque un territorio limitato, aumenti lo stress, ma che questo sia causa diretta del fallimento riproduttivo non è dimostrato. Inoltre, siccome lo studio non riporta dati sui metaboliti dei glucocorticoidi, questa resta un'ipotesi data dal confronto con altre specie di indole solitaria come il leopardo delle nevi (Kinoshita, et al., 2011). Brown et al., 1996, aveva riportato la speculazione secondo cui esista una soppressione dell'attività riproduttiva tra femmine ospitate assieme, dopo aver osservato che, di tre femmine ospitate assieme, le due più giovani ciclano quando quella anziana è in anestro. Altra ipotesi è che il trasferimento della femmina durante il picco di estrogeni per

consentire l'accoppiamento causi stress acuto (Young, et al., 2004), influenzando negativamente sul concepimento. Ad ogni modo, sarebbe necessario proseguire la ricerca valutando sia i metaboliti fecali degli ormoni sessuali, sia quelli dei glucocorticoidi all'interno dello stesso studio.



## 7. Analisi: Lince iberica

### 7.1 Riproduzione e ciclo estrale

La lince iberica (*Lynx pardinus*) è il felino più gravemente minacciato di estinzione, con soli 313 esemplari circa che sopravvivono in natura (Dell'Amore, Febbraio 2017) ed è perciò inserita nell'Appendice I della CITES. Lo scopo delle strutture che ospitano questa specie, situate principalmente in Spagna e Portogallo, è mantenere una diversità genetica dell'80% nella popolazione in cattività e allevare esemplari da reintrodurre in natura. La riproduzione in cattività di questo felino è dunque di primaria importanza. La difficoltà nel perseguire questo obiettivo sta nel fatto che la lince iberica, come la lince eurasiatica spesso usata come modello per lo studio del parente più a rischio, ha una strategia riproduttiva unica all'interno della famiglia dei felidi, cioè è un monoestrone con ovulazione spontanea (Painer, et al., 2014). L'ovulazione, se concomitante ad un accoppiamento non fertile, è seguita dalla formazione del corpo luteo (CL) e dall'inizio della pseudogavidanza; se invece l'accoppiamento è fertile, si forma un CL gravidico e inizia la gestazione, che dura 63-65 giorni (Finkenwirth, Jewgenow, Meyer, Vargas, & Dehnard, 2010). L'altra particolarità delle linci è che il CL persiste ed è funzionale per più due anni, e mantiene i livelli di progesterone in media sui 5ng/mL di siero, tranne nella stagione riproduttiva, avente luogo a gennaio-febbraio (Painer, et al., 2014). Ciò vuol dire che le femmine hanno una sola possibilità di rimanere gravide ogni anno, e se l'accoppiamento fallisce o non ha luogo, si perde il potenziale riproduttivo fino alla stagione successiva. La lince è in grado di diminuire fisiologicamente la produzione di progesterone durante la stagione riproduttiva per permettere il verificarsi dell'estro, la cui durata è 2-5 giorni, ma questo evento non è accompagnato da una regressione strutturale del CL. Le dinamiche con cui avvenga questo meccanismo fisiologico sono ad oggi

sconosciute, inoltre i tentativi di luteolisi artificiale per indurre un secondo estro non hanno finora avuto successo (Painer, et al., 2014).

## 7.2 Metaboliti dei glucocorticoidi

La lince iberica in natura conduce un'esistenza solitaria, e per rispettare questo comportamento, anche in cattività vengono tenute in recinti individuali, unendo maschi e femmine 1-2 mesi prima della stagione riproduttiva e per tutta la durata della stessa, e separati due settimane prima della data presunta del parto (Pribbenow, et al., 2014). La maggior parte delle linci iberiche in cattività si trovano nei centri di riproduzione di Spagna e Portogallo, dove è stato creato un ambiente il più possibile vicino a quello selvatico che promuova la riproduzione naturale e l'espressione di comportamenti come interazioni sociali, caccia e territorialità (Vargas, et al., 2007).

Le variazioni dei metaboliti fecali dei glucocorticoidi sono state studiate nell'ambito dello spostamento dei riproduttori tra questi centri, cercando di correlare alle concentrazioni ormonali rilevate, anche i comportamenti, associati allo stress, osservati dai keeper. Il metodo di misurazione utilizzato è il dosaggio immunoenzimatico (Pribbenow, et al., 2014). È emerso che i maschi tendono ad avere concentrazioni di glucocorticoidi fecali più elevate delle femmine, sia come baseline, sia nei picchi associati a eventi stressogeni acuti. Questi picchi si hanno in concomitanza di eventi quali: cattura, sedazione, introduzione del partner e successiva separazione a fine stagione riproduttiva, l'accoppiamento, e lavori effettuati nella o vicino alla recinzione (es. giardinaggio, preparazione trappole) (Pribbenow, et al., 2014). Il trasporto non rientra tra le cause dei picchi di metaboliti dei glucocorticoidi (in 5 linci su 6 dello studio di Pribbenow et al., 2014), probabilmente perché non sono stati somministrati sedativi-anestetici e le gabbie erano individuali e oscurate. Inoltre, non tutti i picchi sono

accompagnati dall'osservazione di comportamenti associati allo stress. Esiste dunque una grande variabilità inter-individuale delle concentrazioni di glucocorticoidi fecali, per cui se si intendesse valutare meglio lo stress cronico in questa specie, sarebbe meglio raccogliere campioni per estesi periodi di tempo, per ogni esemplare coinvolto, in quanto la risposta allo stress è estremamente soggettiva (Wielebnowski, Ziegler, Wildt, Lukas, & Brown, 2002). Non sono al momento disponibili per la lince iberica dati che correlino lo studio longitudinale dei metaboliti fecali dei glucocorticoidi al tasso di riproduzione.

### 7.3 Metaboliti degli steroidi sessuali

Secondo Dehnhard et al., 2008, studiando la lince eurasiatica come modello per la lince iberica, è emerso che i metaboliti degli estrogeni sono più elevati nelle femmine gravide e pseudogravide, con una concentrazione maggiore e di durata prolungata in quelle gravide (13-14µg/g) (Dehnhard, et al., 2008), che perdura anche immediatamente dopo il parto, sebbene la composizione dei metaboliti sia diversa: prima del parto prevalgono metaboliti del 17-β estradiolo, mentre dopo quelli dell'estrone. Considerando il valore assoluto di questa misurazione, è significativamente più alto in confronto ad altre specie di felini durante la gestazione (Lynx Ex Situ, 2022), ma il paragone può non essere significativo perché i metodi di analisi dei metaboliti cambiano in base allo studio condotto e alla specie interessata.

L'escrezione dei metaboliti del progesterone è rilevabile tutto l'anno a causa dei corpi lutei persistenti (Lynx Ex Situ, 2022), con livelli più elevati nelle femmine gravide e pseudogravide, senza differenze tra le due categorie (12-18µg/g) (Dehnhard, et al., 2008). Questo è confermato dai livelli sierici di P4, più elevati rispetto ai livelli base nelle linci che hanno ovulato, indifferentemente dal concepimento (Lynx Ex

Situ, 2022). Per via dei profili ormonali simili, i metaboliti del progesterone non possono essere utilizzati per fare diagnosi di gravidanza.

La lince iberica ha una buona capacità di adattamento, come dimostrato dalla sua sempre maggiore presenza in aree antropizzate e dall'aumento di casi di predazione del bestiame, quali pollame e pecore d'allevamento estensivo (Garrote, et al., 2013). Si può cautamente affermare che sopporti bene lo stato di cattività, come testimoniano il numero di cuccioli nati nell'ultima decade nei centri riproduttivi (122-136) ed il numero di esemplari rilasciati in natura, cioè circa il 56% dei nuovi nati (Público & P3, 2019) (ICNF, 2022). Per proseguire questo percorso già incoraggiante, sarebbe rilevante condurre un progetto che correli i valori dei metaboliti dei glucocorticoidi con quelli degli steroidi sessuali e con il tasso di riproduzione, considerando anche il numero di parti poiché, nelle primipare, sono frequenti l'aborto, la natimortalità o l'abbandono dei cuccioli, la cui incidenza è meno frequente nelle pluripare (Lynx Ex Situ, 2022). Inoltre, sapendo che picchi di breve durata di glucocorticoidi possono promuovere la produzione di LH (Liptrap & Raeside, 1983), si potrebbe indagare se essi favoriscano un accoppiamento fertile e la successiva nascita di cuccioli sani.

## 8. Analisi: Gatto pescatore

### 8.1 Riproduzione e ciclo estrale

Il gatto pescatore (*Prionailurus viverrinus*) è un piccolo felide asiatico classificato come vulnerabile dalla IUCN ed inserito nell'Appendice II della CITES. Esso presenta un ciclo estrale di circa 20 giorni durante tutto l'anno, ed è quindi poliestrale (Santymire, et al., 2011). In cattività la stagione riproduttiva sembra non essere influenzata dalla stagione climatica, anche se in natura, soprattutto in ambienti umidi con una densità di popolazione maggiore, si colloca a gennaio-febbraio, con i parti aventi luogo da marzo a maggio (Nowell & Jackson, 1996). L'assenza di stagionalità riproduttiva nei felini in cattività si verifica anche nel ghepardo, al contrario leopardo delle nevi, tigre e lince iberica si riproducono in un determinato periodo dell'anno. La gravidanza dura 63-70 giorni (Mellen, 1991) (Nowak, 1999), mentre la pseudogavidanza ne dura circa la metà (Santymire, et al., 2011). Caratteristica unica del gatto viverrino, secondo i dati esistenti su esemplari studiati in cattività, è che sia in grado di ovulare sia spontaneamente che in modo indotto, con una grande variabilità individuale. Ciò significa che una stessa femmina può ovulare spontaneamente ad un ciclo ma non a quello successivo, ed il motivo per cui accade non è conosciuto; si sa soltanto che lo stimolo che innesca l'ovulazione spontanea non è fisico né psico-sessuale (Santymire, et al., 2011). Non è da escludere anche una componente genetica, già dimostrata nel gatto domestico: le femmine che ovulano spontaneamente producono prole con la stessa capacità (Wildt, Brown, & Swanson, Reproduction in cats. In: Knobil, E., Neill, J., Encyclopedia of Reproduction, 1998). È stato osservato che la lunghezza del ciclo estrale varia a seconda del tipo di ovulazione: se è spontanea, il ciclo estrale si prolunga di 8 giorni poiché la fase luteale va a sommarsi a quello che, in assenza di accoppiamento e se l'ovulazione fosse indotta,

sarebbe un ciclo anovulatorio, come accade anche nel gatto domestico (Graham, Swanson, & Brown, Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport, 2000).

## 8.2 Metaboliti del cortisolo

La popolazione in cattività del gatto pescatore presenta un basso successo riproduttivo (Kinzer, 2012), è quindi necessario comprendere meglio la sensibilità di questa specie allo stress derivante da cambiamenti ambientali, primariamente quelli necessari per la sua conservazione negli zoo. Essendo i piccoli felini considerati sia come predatori che come prede, essi sono più soggetti a stressors ambientali (Brown J. , Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids, 2006), per cui ci si aspetta di trovare incrementi nei metaboliti dei glucocorticoidi in seguito a diverse pratiche manageriali e sociali che li coinvolgono. Ad esempio, nello studio di Fazio, et al., 2020, si è visto che i livelli di glucocorticoidi aumentano in situazioni come il trasferimento tra strutture diverse (6 µg/g), sedazione (20 µg/g), malattie croniche (12 µg/g), cambiamenti dell'exhibit e costruzioni nelle sue vicinanze (2-2,5 µg/g), mentre i livelli base, pur con variazioni individuali, si attestano sugli 0,5 µg/g. Nei felini gli eventi stressanti possono portare ad infanticidio e attacchi all'interno delle coppie di riproduttori, incidendo negativamente sul successo riproduttivo, come dimostrato nel ghepardo da Wielebnowski, et al., 2002; perciò è fondamentale individuare fattori che mitighino lo stress: training tra animale e keeper, aree al riparo dal pubblico in cui nascondersi e ospitare gli animali assieme ad altri esemplari, che si tratti di coppie dello stesso sesso o maschi e femmine. Inoltre, individui con una storia di successo riproduttivo hanno valori di glucocorticoidi inferiori rispetto ad altri che non si sono mai riprodotti (Fazio, et al., 2020). Nello studio di Santymire, et al., 2011 la sola femmina rimasta gravida era ospitata

permanentemente in coppia con un maschio. Ipotizzando che il successo riproduttivo venga favorito tenendo insieme coppie fisse di riproduttori, ciò andrebbe curiosamente contro le abitudini della specie in natura, in cui gli adulti senza prole sono solitari (Sunquist & Sunquist, 2002). Infine, parametri come età (Khonmee, et al., 2016), sesso e età allo svezzamento non influenzano le fluttuazioni dei metaboliti, ed è necessario ribadire che esiste un'estrema variabilità individuale nelle loro concentrazioni che non dipende da fattori ambientali e manageriali: picchi di glucocorticoidi si sono verificati anche quando nessuno stressor era stato individuato dai keeper (Fazio, et al., 2020).

### 8.3 Metaboliti degli steroidi sessuali

La valutazione dei metaboliti di estrogeni e progesterone ha permesso di chiarire la fisiologia riproduttiva del gatto pescatore in cattività. I metaboliti degli estrogeni vedono un picco di concentrazione verificarsi ogni circa 20 giorni in concomitanza dell'estro, durante il quale il valore cresce di almeno 5 volte rispetto ai livelli base (500-800 ng/g contro 87 ng/g), indipendentemente dal fatto che il ciclo sia anovulatorio oppure no (Santymire, et al., 2011). Questi metaboliti nel gatto pescatore e in altri piccoli felidi tendono ad essere più elevati, sia come baseline che come picchi, rispetto a felini di grandi dimensioni come ghepardo, tigre e leopardo nebuloso, utilizzando lo stesso dosaggio immunoradiologico (baseline <50 ng/g feci, picchi che raramente eccedono i 500 ng/g) (Brown J., Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids, 2006). Se in seguito al picco di estrogeni i metaboliti del progesterone restano bassi, in linea con la baseline di 4ng/g, probabilmente non si è verificata l'ovulazione; se invece i valori di metaboliti del progesterone si innalzano c'è stata una presunta ovulazione: se si attestano sui 20 ng/g ha inizio della fase luteale non gravidica (pseudogavidanza), che segue un accoppiamento non fertile o, nel caso proprio di questa specie,

un'ovulazione spontanea; se invece i valori arrivano a 50µg/g, ha avuto inizio la gestazione (Santymire, et al., 2011); un tale incremento di metaboliti del progesterone durante la gravidanza avviene anche nel ghepardo (Brown, et al., 1996).

Si evince dalla valutazione dei metaboliti fecali degli ormoni steroidei, che il gatto pescatore è un felino su cui la cattività, specialmente se in una zona geografica lontana dall'habitat naturale, incide sia sulla stagionalità riproduttiva, eliminandola, sia sulla variazione dei metaboliti fecali dei glucocorticoidi. Infatti, esemplari in cattività in Thailandia presentano un aumento delle concentrazioni durante la stagione delle piogge (Khonmee, et al., 2016), ma questa correlazione con la stagione climatica non è dimostrata negli esemplari degli zoo nordamericani (Fazio, et al., 2020) (Santymire, et al., 2011). Sono dunque necessari ulteriori studi longitudinali che meglio definiscano la correlazione tra FGM, metaboliti degli steroidi sessuali e successo riproduttivo nella stessa popolazione ex situ del gatto pescatore.



## 9. Analisi: Tigre

### 9.1 Riproduzione e ciclo estrale

La tigre (*Panthera tigris*) è un felino solitario a rischio di estinzione, a causa principalmente della perdita di habitat e del bracconaggio. Il numero di tigri tenute in cattività nel mondo è tra i 15'000 e 20'000 esemplari, numero che sorpassa di cinque volte quelle che sopravvivono in natura (Luo, et al., 2008). Come testimoniano queste cifre, i programmi di conservazione delle tigri sono molteplici, ma resta ancora molto da imparare sulla fisiologia di questa specie per poterle garantire un maggiore benessere in cattività.

È un felino poliestrale che presenta un'ovulazione indotta (Brown J. , Female reproductive cycles of wild female felids, 2010) e una stagionalità riproduttiva poco definita, in quanto c'è molta variabilità nei pattern endocrini tra individui, probabilmente influenzati dalla latitudine e dalla quantità di luce artificiale a cui sono esposti negli zoo (Graham, et al., 2006). Una certa stagionalità è invece dimostrata nella sottospecie di tigre siberiana (*P. tigris altaica*), nella quale le femmine mostrano ciclicità estrale tra gennaio e giugno, e anestro durante il resto dell'anno. Graham et al., 2010 ha anche evidenziato come, in generale all'interno della specie, esistano periodi di anestro non correlati al periodo dell'anno, come accade anche nel ghepardo. Il ciclo estrale ha lunghezza variabile a seconda che sia anovulatorio (18gg) o che abbia avuto luogo un accoppiamento non fertile (40gg), cui segue una fase luteale non gravidica di circa 35 giorni; se l'accoppiamento invece è fertile inizia la gestazione la cui durata è circa 108 giorni, sorpassata la metà della quale non si assiste ad un aumento di estrogeni come avviene invece nel gatto pescatore e nel ghepardo (Brown J. , Female reproductive cycles of wild female felids, 2010). L'estro dura circa tre giorni (Graham, et al., 2006).

## 9.2 Gestione ed accasamento in cattività

Secondo le linee guida dell'Association of Zoos and Aquariums (AZA) per la cura delle tigri, esse andrebbero tenute in recinti individuali, essendo animali solitari. Se gli esemplari sono tolleranti, è possibile ospitare insieme coppie di fratelli o sorelle, e ovviamente madri con i cuccioli fino alla loro maturità sessuale. Maschi e femmine andrebbero uniti solo quando la femmina è in estro, e dopo un'introduzione graduale alla presenza del partner. Nonostante questa raccomandazione, molti parchi faunistici ospitano coppie di riproduttori assieme per tutto l'anno, sia per motivi logistici sia perché la presenza del maschio accresce la produzione di estradiolo ed è quindi più probabile che l'accoppiamento sia fertile (Graham, et al., 2006). Una buona via di mezzo sarebbe consentire alla femmina il solo contatto visivo, o meglio olfattivo con il partner, situazione che rispecchia maggiormente la condizione che avverrebbe allo stato selvatico (Tilson, et al., 2016).

## 9.3 Metaboliti dei glucocorticoidi

La tigre è una specie che risente degli eventi stressanti con un'ampia variabilità sia a livello individuale, che di popolazione. Ad esempio, i livelli base dei metaboliti del corticosterone variano tra animali di zoo diversi, come evidenziato nello studio di Parnell et al., 2014, che ha paragonato le concentrazioni di 3 popolazioni di tigri in tre zoo australiani (paragone possibile perché è stato utilizzato lo stesso dosaggio immunoenzimatico). La popolazione con la concentrazione minore era composta da esemplari imparentati, per cui è possibile che i comportamenti di dominanza e subordinazione, che normalmente innalzerebbero i glucocorticoidi, fossero mitigati (Parnell T. , et al., 2014). Tra i fattori che possono influenzare la concentrazione di glucocorticoidi ci sono le caratteristiche dei recinti (densa vegetazione,

design naturalistico e arricchimenti abbassano i metaboliti), il momento del campionamento, il tipo di accasamento degli animali, il training condotto dai keeper e variabili genetiche (Parnell T. , et al., 2014).

Un altro esempio è riportato da Jepsen et al., 2021 che, valutando i livelli di glucocorticoidi in 7 popolazioni di tigri, ha evidenziato come i profili siano simili tra le popolazioni selvatiche e quelle in cattività. L'unico dato che si discosta appartiene ad un gruppo di tigri esibite in un giardino zoologico con recinti di dimensioni minori e confinanti con exhibit di altri predatori (leoni e leopardi); è dunque probabile che siano queste due condizioni manageriali l'evento stressante che genera il dato deviato (Jepsen, et al., 2021). Sembra che la cattività di per sé non stimoli una risposta adrenocorticale e quindi non sia causa diretta di stress, il che potrebbe spiegare come mai le tigri, insolitamente per un grande felino, si riproducano bene in cattività (Brown J. , Female reproductive cycles of wild female felids, 2010). Al contrario la pressione antropica (Naidenko, Kumar, Berezhnoi, & Umapathy, 2019), trasferimenti tra strutture e procedure veterinarie invasive come la sedazione stimolano una risposta adrenocorticale perché contemplano un cambiamento ambientale o dell'omeostasi (Parnell T. , et al., 2014). Per quanto riguarda l'influenza del sesso sulla concentrazione di glucocorticoidi, ci sono dati contrastanti: nello studio di Parnell et al., 2014, le femmine hanno concentrazioni più elevate dei maschi (45 ng/g vs 5-15 ng/g), mentre in Jepsen et al., 2021, sono solo le femmine gravide ad avere concentrazioni più elevate di maschi e femmine non gravide. Questa differenza può essere dovuta sia al diverso metodo di misurazione dei metaboliti, oppure alla diversa fase del ciclo estrale in cui si trovavano le femmine al momento dello studio, poiché essa impatta differenzialmente sulla concentrazione dei metaboliti (Kinoshita, et al., 2011). Quest'ultima non varia nemmeno in relazione alla stagione climatica, probabilmente perché nei parchi

faunistici viene sempre offerto cibo in abbondanza ed la presenza di rifugi permette agli animali di ripararsi e nascondersi anche durante l'inverno, quando il calo delle temperature, in altre condizioni, farebbe aumentare lo stress (Jepsen, et al., 2021) (Naidenko, Kumar, Berezhnoi, & Umapathy, 2019).

## 9.4 Metaboliti degli steroidi sessuali

L'analisi dei metaboliti fecali degli steroidi sessuali conferma che la tigre presenta un'ovulazione indotta, infatti la concentrazione dei metaboliti del progesterone aumenta dopo l'accoppiamento e, se questo è fertile, rimane elevata durante tutta la gestazione (4800 ng/g DF), altrimenti scende alla fine della fase luteale non gravidica (Graham, et al., 2006) tornando ai livelli base di circa 490 ng/g DF (Mondol, Booth, & Wasser , 2020). I metaboliti fecali degli estrogeni presentano una concentrazione base di circa 65 ng/g durante il ciclo estrale con picchi di 167 ng/g in concomitanza con l'estro; è inoltre stato osservato che questi picchi sono più elevati in femmine accasate con un maschio, la cui presenza infatti accresce la produzione di estradiolo e sembra favorire un'attività ovarica regolare (Graham, et al., 2006). Si potrebbe sfruttare questo tipo di accasamento in coppia per tentare di indurre una gravidanza anche in femmine acicliche precedentemente ritenute inadatte alla riproduzione (Tilson, et al., 2016).

In conclusione, sarebbe da indagare il legame tra il tipo di accasamento, metaboliti di glucocorticoidi e successo riproduttivo degli esemplari femmina, per capire quale sia la gestione sociale e ambientale che offra il minor stress e il maggior successo riproduttivo.

## Conclusione

Nel presente elaborato è stato descritto come la famiglia dei felidi possieda una gamma di strategie riproduttive più variegata di quello che si riteneva tradizionalmente, andando da specie poliestrali con ovulazione indotta a specie monoestrali con ovulazione spontanea. È stato anche descritto come le principali cause di stress siano comuni a tutte le specie, ma la risposta verso di esso sia fortemente individuale. Avendo i metaboliti fecali degli ormoni steroidei un'ampia variabilità inter e intra-specifica, è necessario studiare più esemplari possibili a livello mondiale e per lunghi periodi di tempo, in modo da ottenere risultati validi, scoprire nuove fonti di stress e mitigarle, e comprendere a fondo la fisiologia riproduttiva dei felini. In alcuni casi sarà necessario trovare un compromesso, perché non sempre meno stress vuol dire maggiore successo riproduttivo, come nel caso della tigre, ma lo scopo sarà comunque raggiunto se verrà garantita la sopravvivenza in cattività di popolazioni sane di questi carismatici animali.

## Bibliografia

(s.d.). Tratto da CITES: <https://cites.org/eng>

(s.d.). Tratto da CITES commercio internazionale fauna e flora:  
[https://www.esteri.it/it/politica-estera-e-cooperazione-allo-sviluppo/politica\\_europea/politica-commerciale-internazionale/import-export/cites-commercio-internazionale/](https://www.esteri.it/it/politica-estera-e-cooperazione-allo-sviluppo/politica_europea/politica-commerciale-internazionale/import-export/cites-commercio-internazionale/)

(s.d.). Tratto da Gazzetta Ufficiale:  
<https://www.gazzettaufficiale.it/eli/id/1976/02/24/075U0874/sg>

(s.d.). Tratto da LIFE Lynx: <https://www.lifelynx.eu/>

Breazile, J. (1987). Physiologic basis and consequences of distress in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*.

Brown, J. (2006). Comparative endocrinology of domestic and nondomestic felids. *Theriogenology*, 25-36.

Brown, J. (2010). Female reproductive cycles of wild female felids. *Animal Reproduction Science*, 155-162.

Brown, J., Graham, L., Wielebnowski, N., Swanson, W., Wildt, D., & Howard, J. (2001). Understanding the basic reproductive biology of wild felids by monitoring of faecal steroids. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplements*, p. 57:71-82.

Brown, J., Wasser, S., & Graham, L. (1994). *Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces*. Tratto da Pubmed:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7819459/>

Brown, J., Wildt, D., Wielebnowski, N., Goodrowe, K., Graham, L., Wells, S., & Howard, J. (1996). Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 337-346.

Buffington, T., & Bain, M. (2022, Gennaio 30). *Stress and feline health*. Tratto da Pubmed.

Caro, T. (1993). Behavioral solutions to breeding cheetahs in captivity: insights from the wild. *Zoo Biology*, 19-30.

- Carrie, J. (2017, Settembre 25). *Metabolized vs free cortisol: understanding the difference*. Tratto da Dutch Test: <https://dutchtest.com/2017/09/25/metabolized-versus-free-cortisol-understanding-the-difference/>
- Cecchin, D., & Bui, F. (s.d.). *Medicina nucleare 1 - Lezione 7: Generalità sul RIA*. Tratto da Unibersità - Ospedale di Padova: [https://www.unipd.it/nucmed/TF/TSRM/vitro/TSRM\\_vitro\\_L7.pdf](https://www.unipd.it/nucmed/TF/TSRM/vitro/TSRM_vitro_L7.pdf)
- Chakraborty, S., Pramanik, J., & Mahata, B. (2021). Revisiting steroidogenesis and its role in immune regulation with the advanced tools and technologies. *Nature*, 125-140.
- CITES - Ministero della Transizione Ecologica. (s.d.). Tratto da <https://www.mite.gov.it/pagina/cites-convenzione-di-washington-sul-commercio-internazionale-delle-specie-di-fauna-e-flora>
- Dehnhard, M., Naidenko, S., Frank, A., Braun, B., Goritz, F., & Jewgenow, K. (2008). Non-invasive monitoring of hormones: a tool to improve reproduction and captive breeding of the eurasian lynx. *Reproduction of Domestic Animals*, 74-82.
- Dell'Amore, C. (Febbraio 2017). Piccoli grandi felini. *National Geographic*.
- Dosaggio radioimmunologico - RIA. (s.d.). Tratto da Gentaur: <https://gentaur.it/enciclopedia/dosaggio-radioimmunologico-ria>
- Fazio, J. M., Freeman, E., Bauer, E., Rockwood, L., Brown, J., Hope, K., . . . Parsons, E. (2020). Longitudinal fecal hormone monitoring of adrenocortical function in zoo housed fishing cats (*Prionailurus viverrinus*) during institutional transfers and breeding introductions. *PLOS ONE*.
- Finkenwirth, C., Jewgenow, K., Meyer, H., Vargas, A., & Dehnhard, M. (2010). PGFM (13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2a</sub>) in pregnant and pseudo-pregnant Iberian lynx: a new noninvasive pregnancy marker for felid species. *Theriogenology*, 530-540.
- Garrote, G., Lopez, G., Gil-Sanchéz, J., Rojas, E., Ruiz, M., Bueno, J., . . . Simon, M. (2013). Human-felid conflict as a further handicap to the conservation of the critically endangered Iberian lynx. *European journal of Wildlife Research*, 287-290.
- Graham, L., Byers, A., Armstrong, D., Loskutoff, N., Swanson, W., Wildt, D., & Brown, J. (2006). Natural and gonadotropin-induced ovarian activity in tigers (*Panthera tigris*) assessed by fecal steroid analyses. *General and Comparative Endocrinology*, 362-370.

- Graham, L., Swanson, W., & Brown, J. (2000). Chorionic gonadotropin administration in domestic cats causes an abnormal endocrine environment that disrupts oviductal embryo transport. *Theriogenology*, 1117-1131.
- Hutchins et al. (2003). Tratto da pubmed.
- ICNF. (2022). *Reintroducao*. Tratto da Lince-ibérico - ICNF: <http://areasprotegidas.icnf.pt/lince/index.php/documentacao/publicacoes-cientificas>
- IUCN Red List*. (s.d.). Tratto da <https://www.iucnredlist.org/>
- Jepsen, E. J., Scheun, J., Dehnhard, M., Kumar, V., Umapathy, G., & Ganswindt, A. (2021). Non-invasive monitoring of glucocorticoid metabolite concentrations in native Indian, as well as captive and re-wilded tigers in South Africa. *General and Comparative Endocrinology*.
- Johansson, O., Ausilio, G., Low, M., Lkhagvajav, P., Weckworth, B., & Sharma, K. (2020, Ottobre 12). *The timing of breeding and independence for snow leopard females and their cubs*. Tratto da Springer Link: <https://link.springer.com/article/10.1007/s42991-020-00073-3>
- Johnson, L., & Gay, V. (1981). Luteinizing hormone in the cat. I. Tonic secretion. *Endocrinology*, 240-246.
- Khonmee, J., Vorawattanatham, N., Pinyopummin, A., Thitaram, C., Somgird, C., Punyapornwithaya, V., & Brown, J. (2016). Assessment of faecal glucocorticoid metabolite excretion in captive female fishing cats (*Prionailurus viverrinus*) in Thailand. *Conservation Physiology*.
- Kinoshita, K., Inada, S., Seki, K., Sasaki, A., Hama, N., & Kusunoki, H. (2011, Maggio 2). *Long-Term Monitoring of Fecal Steroid Hormones in Female Snow Leopards (Panthera uncia) during Pregnancy and Pseudopregnancy*. Tratto da Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21559303/>
- Kinoshita, K., Ohazama, M., Ishida, R., & Kusunoki, H. (2011). Daily fecal sex steroid hormonal changes and mating success in female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in Japan. *Animal Reproduction Science*, 204-210.
- Kinzer, J. (2012). Fishing cat Red program recommendations. 1-2.



- LIFE Programs*. (s.d.). Tratto da European Commission:  
[https://cinea.ec.europa.eu/life\\_en](https://cinea.ec.europa.eu/life_en)
- Liptrap, & Raeside. (1983). Effect of cortisol on the response to gonadotrophin releasing hormone in the boar. *Journal of Endocrinology*, 75-81.
- Luo, S.-J., Johnson, W., Martenson, J., Antunes, A., Martelli, P., Uphyrkina, O., . . . O'Brien, S. (2008). Subspecies genetic assignments of worldwide captive tigers increase conservation value of captive populations. *Current Biology*, 592-596.
- Lynx Ex Situ. (2022). *Animal Handling*. Tratto da Programa del Conservacion ex situ del Lince iberico:  
<https://www.lynxexsitu.es/programa-en.php?sec=manejo>
- Macri, A., & Patterson-Kane, E. (2011). Behavioural analysis of solitary versus socially housed snow leopards (*Panthera uncia*), with the provision of simulated social contact. *Applied Animal Behaviour Science*, 115-123. Tratto da Elsevier - .
- Marker, L. (2002). *Aspects of cheetah (Acinonyx jubatus) biology, ecology and conservation strategies on Namibian farmlands. Dissertation*. Oxford: University of Oxford.
- Mellen, J. (1991). Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felidae* spp.): a multiple regression analysis. *Zoo Biology*, 95-110.
- Mondol, S., Booth, R. K., & Wasser , S. K. (2020). Fecal stress, nutrition and reproductive hormones for monitoring environmental impacts on tigers (*Panthera tigris*). *Conservation Physiology* .
- Mostl, E., Rettenbacher, S., & Palme, R. (2005). Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 17-34.
- Naidenko, S., Kumar, V., Berezhnoi, M., & Umapathy, G. (2019). Comparison of tigers' fecal glucocorticoids level in two extreme habitats. *PloS ONE*.
- Nogueira, C., & Silva, J. (1997, Brazil). *Plasma cortisol levels in captive wild felids after chemical restraint*. Tratto da SciELO - Brazil:  
<https://www.scielo.br/j/bjmb/a/HQLcCxy6WxCT8qsVQLF95yQ/?lang=en>

- Nowak, R. (1999). *Walker's Mammals of the World*. Baltimore: John Hopkins University Press.
- Nowell, K., & Jackson, P. (1996). *Wild cats: status survey and conservation plan*. Tratto da IUCN:  
<https://www.iucn.org/resources/publication/wild-cats-status-survey-and-conservation-action-plan>
- Painer, J., Goeritz, F., Dehnhard, M., Hildebrandt, T., Naidenko, S., Sanchez, I., . . . Jewgenow, K. (2014). Hormone-induced luteolysis on physiologically persisting corpora lutea in Eurasian and Iberian lynx (*Lynx lynx* and *Lynx pardinus*). *Theriogenology*, 557-562.
- Painer, J., Jewgenow, K., Dehnhard, M., Arnemo, J., Linnell, J., Odden, J., . . . Goeritz, F. (2014, Marzo 5). *Physiologically persisting corpora lutea in Eurasian lynx (Lynx lynx) - Longitudinal ultrasound and endocrine examinations intra-vitam*. Tratto da PMC PubMed Central:  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943960/>
- Palme, R. (2019). *Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems*. Tratto da Elsevier.
- Palme, R., Touma, C., Arias, N., Dominchin, M., & Lepschy, M. (12 Agosto 2013). Steroid extraction: Get the best out of faecal samples. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift - Veterinary Medicine Austria*, 238-245.
- Parnell, T., Narayan, E. J., Magrath, M. J., Roe, S., Clark, G., Nicolson, V., . . . Hero, J.-M. (2014). *Evaluating physiological stress in Sumatran tigers (Panthera tigris ssp. sumatrae) managed in Australian zoos*. Tratto da Pubmed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27293659/>
- Parnell, T., Narayan, E., Magrath, M., Roe, S., Clark, G., Nicolson, V., . . . Hero, J. (2014). Evaluating physiological stress in Sumatran tigers (*Panthera tigris ssp. sumatrae*) managed in Australian zoos. *Conservation Physiology*.
- Pozzolo, P. (2021, Gennaio 16). *Coefficiente di variazione statistica*. Tratto da Paola Pozzolo - La tua statistica:  
<https://paolapozzolo.it/coefficiente-di-variazione-statistica/>
- Pribbenow, S., Jewgenow, K., Vargas, A., Serra, R., Naidenko, S., & Dehnhard, M. (2014). Validation of an enzyme immunoassay for the measurement of faecal glucocorticoid metabolites in Eurasian (*Lynx lynx*) and iberian lynx (*Lynx pardinus*). *General and Comparative Endocrinology*, 166-177.

- Pùblico, & P3. (2019, 10 30). *Ha dez anos Azahar chegou centro lince silves*. Tratto da Publico:  
<https://www.publico.pt/2019/10/30/p3/fotogaleria/ha-dez-anos-azahar-chegou-centro-lince-silves-398174>
- Reazioni di fase II*. (s.d.). Tratto da Docenti.unina:  
<https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/34061249>
- Reichert-Stewart, J., Santymire, R., Armstrong, D., Harrison, T., & Herrick, J. (2014). Fecal endocrine monitoring of reproduction in female snow leopards (*Panthera uncia*). *Theriogenology*, 17-26.
- Robson, M., Taboda, J., & Wolfsheimer, K. (1998, Febbraio). *La funzione delle surreni nel gatto*. Tratto da Veterinaria - Official Journal of SCIVAC: <https://veterinaria.scivac.org/>
- Santymire, R. M., Brown, J., Stewart, R., Santymire, R., Wildt, D., & Howard, J. (2011). Reproductive gonadal steroidogenic activity in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*) assessed by fecal steroid analyses. *Animal Reproduction Science*, 60-72.
- Sapolsky, R., Romero, L., & Munck, A. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinology Review*, 55-89.
- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E., Gilligan, L., Taylor, A., Arlt, W., . . . Storbeck, K.-H. (2019). *Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review*. Tratto da Elsevier:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076019302791?via%3Dihub>
- Sjaastad, O., Sand, O., & Hove, K. (2010). Fisiologia degli animali domestici. In O. Sjaastad, O. Sand, & K. Hove, *Fisiologia degli animali domestici* (p. 238-239). Casa Editrice Ambrosiana.
- Sunquist, M., & Sunquist, F. (2002). *Wild cats of the world*. Chicago: University of Chicago Press.
- Terio, K., Citino, S., & Brown, J. (1999, Dicembre). *Fecal cortisol metabolite analysis for noninvasive monitoring of adrenocortical function in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)*. Tratto da Pubmed:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10749432/>

- Terio, K., Marker, L., & Munson, L. (2004). Evidence for chronic stress in captive but not free-ranging cheetahs (*Acinonyx jubatus*) based on morphology and function. *Journal of Wildlife Diseases*, 259-266.
- Tilson, R., Morris, C., Armstrong, D., Napier, J., Goodrowe Beck, K., Goldfarb, A., . . . Harris, T. (2016). *Tiger Care Manual*. Tratto da AZA Tiger Species Survival Plan. Tiger Care Manual. Association of Zoos and Aquariums, Silver Spring MD:  
[https://assets.speakcdn.com/assets/2332/tiger\\_care\\_manual\\_2016.pdf](https://assets.speakcdn.com/assets/2332/tiger_care_manual_2016.pdf)
- Vargas, A., Sanchez, I., Martinez, F., Rivas, A., Godoy, J., Roldan, E., . . . Breitenmoser, U. (2007, Ottobre 23). *The Iberian lynx (Lynx pardinus) conservation breeding program*. Tratto da Wiley.com:  
[https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1748-1090.2007.00036.x?casa\\_token=lr8LzNoJ1BUAAAAA:ioq8qk4JYYrliEotzIzbficQpeUrP1Fk9WfrxfLCI2PPzSTWl1OS0oMR1-f8IDyHpRoqOsvJ\\_OTVKQ](https://zslpublications.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdfdirect/10.1111/j.1748-1090.2007.00036.x?casa_token=lr8LzNoJ1BUAAAAA:ioq8qk4JYYrliEotzIzbficQpeUrP1Fk9WfrxfLCI2PPzSTWl1OS0oMR1-f8IDyHpRoqOsvJ_OTVKQ)
- Vazquez-Pertejo, M. (2020, Giugno). *Test immunologici per malattie infettive*. Tratto da MSD Manuals: <https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-infettive/diagnosi-di-laboratorio-delle-malattie-infettive/test-immunologici-per-malattie-infettive>
- WAZA. (2015). *Animal Welfare Strategies*. Tratto da WAZA - World Association of Zoos and Aquariums:  
<https://www.waza.org/priorities/animal-welfare/animal-welfare-strategies/>
- Wielebnowski, N., Ziegler, K., Wildt, D., Lukas, J., & Brown, J. (2002). Impact of the social management on reproductive, adrenal and behavioural activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Animal Conservation*, 291-301.
- Wildt, D., Brown, J., & Swanson, W. (1998). *Reproduction in cats*. In: *Knobil, E., Neill, J., Encyclopedia of Reproduction*. New York: Academic Press Inc.
- Wildt, D., Brown, J., Bush, M., Barone, M., Cooper, K., Grisham, J., & Howard, J. (1993). Reproductive status of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) in North American zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. *Zoo Biology*, 45-80.
- Wildt, D., O'Brien, S., Howard, J., Caro, T., Roelke, M., Brown, J., & Bush, M. (1987). Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. *Biology of Reproduction*, 351-360.

Wudy, A., Schuler, G., Sánchez-Guijo, A., & Hartmann, M. (2018, maggio). The art of measuring steroids: Principles and practice of current hormonal steroid analysis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 88-103. Tratto da Elsevier:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960076017302509?via%3Dihub>

Young, K., Walker, S., Lanthier, C., Waddell, W., Monfort, S., & Brown, J. (2004). Noninvasive monitoring of adrenocortical activity in carnivores by fecal glucocorticoid analyses. *General and Comparative Endocrinology*, 148-165.