



# UNIVERSITÀ DI PARMA

**Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie**

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

## **VALUTAZIONE DEI LIQUIDI FETALI NELLA SPECIE FELINA**

## **EVALUATION OF FETAL FLUIDS IN THE FELINE SPECIES**

**Relatore:**

**Chiar.mo Prof. Enrico Bigliardi**

**Correlatore:**

**Dott. Matteo Rizzi**

**Laureanda:**

**Francesca Ferrari**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**

## **SOMMARIO:**

<b>RIASSUNTO.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>4</b>
<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Apparato genitale .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Ciclo estrale.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Accoppiamento, ovulazione e fecondazione.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Embriogenesi.....</b>	<b>16</b>
<b>1.5 Sviluppo degli annessi fetali.....</b>	<b>24</b>
<b>1.6 Sviluppo dei liquidi fetali.....</b>	<b>30</b>
<b>1.7 Diagnosi di gravidanza.....</b>	<b>31</b>
<b>2. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>45</b>
<b>3. RISULTATI.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1 Enzimi epatici.....</b>	<b>51</b>
<b>3.2 Enzimi renali.....</b>	<b>54</b>

<b>3.3</b>	<b>Enzimi pancreatici.....</b>	<b>56</b>
<b>3.4</b>	<b>Enzimi muscolari.....</b>	<b>56</b>
<b>3.5</b>	<b>Enzimi del metabolismo lipidico.....</b>	<b>58</b>
<b>3.6</b>	<b>Proteine totali, glucosio e globuline.....</b>	<b>58</b>
<b>3.7</b>	<b>Peso specifico.....</b>	<b>59</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSIONE.....</b>	<b>60</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>65</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>66</b>

## **RIASSUNTO**

Questo studio, svolto all'interno della sezione di Ostetricia, Andrologia e Fecondazione Animale del dipartimento di scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma vuole indagare la presenza e la rispettiva concentrazione di enzimi deputati a varie funzioni nei liquidi fetali di feti felini asportati durante procedure di ovarioisterectomia svolte su gatte di colonia all'interno di un programma di controllo della popolazione felina nella Regione Emilia-Romagna.

L'analisi di queste concentrazioni enzimatiche nel liquido amniotico e nel liquido allantoideo ha reso possibile il riconoscimento di differenze, per alcuni parametri significative, nelle diverse fasi della gestazione.

I dati riscontrati relativi ai liquidi fetali sono stati messi in relazione a valori delle concentrazioni degli stessi enzimi nel siero materno prelevato nello stesso periodo gestazionale. Il risultato principale è stata la conferma di come i liquidi fetali non siano derivati dalla semplice filtrazione del sangue materno, ma nella loro formazione concorrano processi più complessi.

In generale le composizioni del liquido amniotico e del liquido allantoideo sono risultate simili, con leggere variazioni riportate in questo elaborato di tesi, in cui si è tentato di definire un processo causale che ha portato a tali risultati.

I dati elaborati sono stati poi confrontati con dati relativi ad analisi simili svolte in precedenza su altre specie, in particolare quella canina, ovina, bufalina e umana. Il paragone con altre specie ha permesso di riscontrare punti in comune oltre che alcune differenze.

## **ABSTRACT**

This study, carried out within the Department of Obstetrics, Andrology and Animal Fertilization of the Department of Veterinary Sciences of the University of Parma, aims to investigate the presence and concentration of enzymes responsible for various functions in fetal fluids of feline fetuses removed during ovariohysterectomy procedures, performed on stray cats as part of a feline population control programme in the Emilia-Romagna Region.

The analysis of these enzymatic concentrations in the amniotic fluid and in the allantoid fluid made it possible to recognize differences for some parameters significant at different stages of gestation.

The data found regarding fetal fluids were related to values of the concentrations of the same enzymes in the maternal serum collected in the same gestational period. The main result was the confirmation of how fetal fluids are not derived from simple filtration of maternal blood, however, more complex processes contribute to their formation.

In general, compositions of amniotic fluid and allantoid fluid were similar, with variations reported in this thesis, which sought to define a causal process that led to these results.

The processed data were then compared to those relating to similar analysis previously carried out on other species, in particular in dogs, sheep, buffalo and humans. Such comparison with other species has enabled us to find points in common along with some differences.

# **1. INTRODUZIONE**

I liquidi fetali sono fluidi contenuti all'interno degli annessi embrionali, membrane che si formano nell'area extraembrionale a partire da estensioni dei foglietti embrionali e che permettono lo sviluppo, in primo luogo dell'embrione e successivamente del feto (Pelagalli et al., 2014).

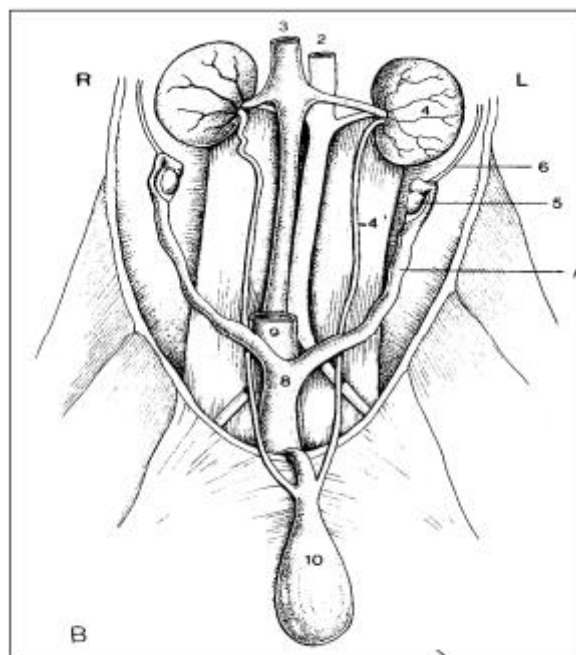
Le funzioni dei liquidi fetali sono varie e comprendono gli scambi ormonali, metabolici e gassosi (Minazaki et al., 2008) oltre che la funzione di protezione fisica. Perché si formino è però necessario l'instaurarsi di una gravidanza, avvenimento indissolubilmente legato all'anatomia e fisiologia riproduttiva della gatta.

## **1.1 Apparato genitale femminile**

L'apparato genitale femminile della gatta è composto da ovaie, tube uterine, utero bicorni, cervice, vagina e vulva. Le ovaie, organo pari con una lunghezza di circa 8-9 mm, sono situate in cavità addominale, al di sotto della III-IV vertebra lombare, in parte coperte dalla borsa ovarica, formata dalla porzione distale di mesovario e mesosalpinge (Christiansen, 1987). Oltre alle strutture appena citate, le ovaie sono fissate da legamenti: il legamento sospensore e proprio (Dyce et al., 2006). Le tube uterine, con una lunghezza di 3-5 cm (McDonald, 1989), sono formate da un'apertura imbutiforme, l'infundibolo, che permette la comunicazione con l'ovaio, oltre che da ampolla e istmo, strutture con andamento flessuoso che terminano nel corno uterino corrispondente. Le corna uterine sono a loro volta strutture pari, che mettono in comunicazione le tube uterine e il corpo dell'utero. Sono strutture lunghe e strette, che misurano circa 6-10 cm

(McDonald, 1989). Il corpo dell'utero, di circa 1,5-2 cm (McDonald, 1989), è situato in vicinanza del margine posteriore del pube e comunica caudalmente con il collo dell'utero o cervice, struttura tubulare lunga circa 1-1,5 cm (McDonald, 1989), che si interpone tra utero e vagina. La vagina si estende orizzontalmente attraverso la pelvi prima di piegare ventralmente oltre l'arcata ischiatica e di congiungersi con il vestibolo, che prosegue inclinandosi verso il basso. Seguono poi le strutture genitali esterne: labbra vulvari, con la fossetta clitoridea e il clitoride (Christiansen, 1987; Dyce et al., 2006).

*Figura 1. Anatomia dell'apparato genitale femminile nella gatta. Dyce et al., 2006.*



**2, aorta; 3, v. cava caudale; 4, 4' rene sinistro ed uretere;  
5, ovaio; 6, legamento sospensore dell'ovaio; 7, corno uterino;  
8, corpo dell'utero; 9, retto; 10, vescica, rovesciata caudalmente**

## 1.2 Ciclo estrale

Il gatto domestico è un animale poliestrale stagionale ad ovulazione indotta. Con il termine poliestrale stagionale si intende la capacità di presentare cicli estrali ripetuti, che si susseguono nella stagione riproduttiva, alternati a periodi di anestro, che insorgono in relazione a variazioni nel fotoperiodo. I cicli estrali ripetuti si riscontrano nei mesi da gennaio a settembre, mentre lasciano spazio ad un periodo di anestro nei mesi da ottobre a dicembre (Tsutsui et al., 2004; Duke 2002; Tsutsui et al., 1993). Tuttavia l'ovulazione, salvo alcune eccezioni, è indotta, ovvero avviene qualora sia avvenuto l'accoppiamento o vi sia stata comunque una stimolazione meccanica della cervice, responsabile del rilascio del picco preovulatorio di LH. L'eccezione è data dalla capacità di alcune gatte, anche fino al 30%, di ovulare spontaneamente (Lawler et al., 1993).

Il primo estro, che corrisponde all'inizio della pubertà nella gatta, insorge in momenti diversi, che variano in base a fattori ambientali, fattori psicologici, al periodo della nascita e alla razza. In media la pubertà si manifesta a circa 8-13 mesi, ma è appunto presente grande variabilità, che porta ad un range molto più ampio: tra i 5 e i 18 mesi (McDonald, 1989). Un fattore particolarmente importante è il momento della nascita in relazione alla stagione riproduttiva, si è visto infatti che gattine nate tra marzo e giugno presentano il primo estro a circa 11-12 mesi, a differenza di quelle nate tra giugno e ottobre, in cui invece l'insorgenza della pubertà avviene verso gli 8 mesi oppure l'anno successivo, verso i 17 mesi (Tsutsui et al., 2004). Secondo alcuni autori vi è correlazione tra raggiungimento dell'80% del peso corporeo e l'insorgenza del primo calore (England et al. 2013). La





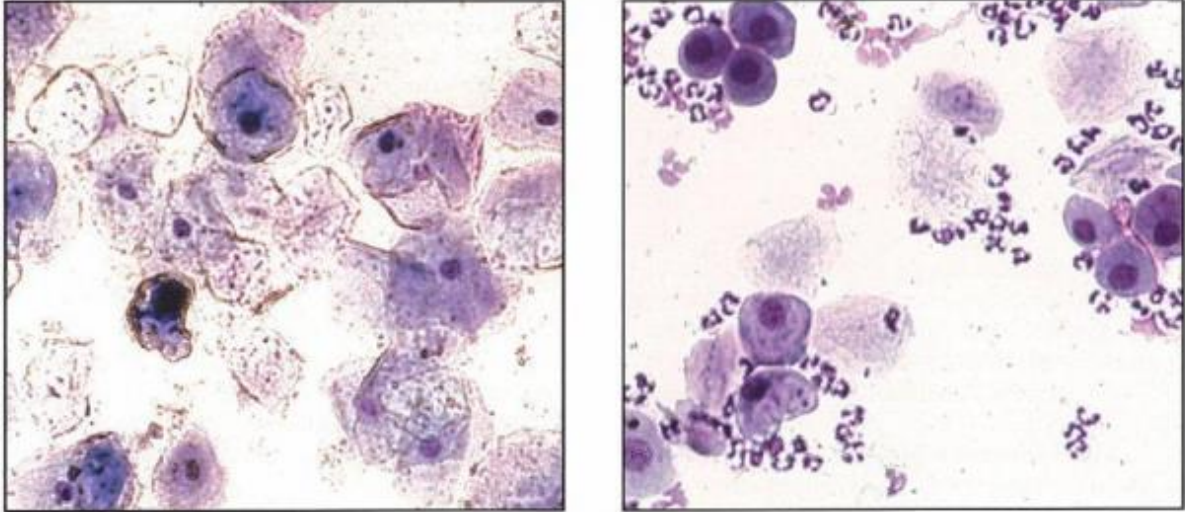
Nella gatta il ciclo estrale può essere suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, diestro e anestro.

Il proestro è un periodo di durata media di 1,5-2 giorni, durante il quale vi è uno sviluppo selettivo di un gruppo di 3-7 follicoli ovarici, accompagnato da atresia dei follicoli restanti. Durante questa fase c'è un aumento progressivo di estrogeni, associato a manifestazioni comportamentali diverse nella gatta, in particolare aumentano i comportamenti di affetto verso i proprietari, lo sfregamento di testa e collo, miagolii, rotolamento e frequenza di minzione, tuttavia, nonostante l'attrazione del maschio, non accettano ancora l'accoppiamento. In questa fase è già possibile notare edema della vulva.

La fase successiva è l'estro, di durata media di 5-6 giorni, ma con variazioni da un minimo di 2 a un massimo di 20 giorni (Root et al, 1995), grande ruolo nel determinare la durata è dato dall'avvenuto accoppiamento. L'estro è caratterizzato da un picco estrogenico in cui i livelli di estrogeni nel sangue superano i 20 pg/ml, per poi diminuire successivamente alla monta. In questo periodo la gatta presenta anoressia, poliuria, posizione accucciata con innalzamento della regione pelvica, associato a movimenti ritmici delle zampe e miagolii simili ad un pianto volti a richiamare il maschio. È da sottolineare come però i segni comportamentali dell'estro non accompagnino sempre tale fase (Wildt et al., 2004).

Nella fase estrale lo spessore dell'epitelio vaginale raggiunge le dimensioni massime e all'esame colpocitologico, da svolgere prestando attenzione a non andare troppo in profondità per non stimolare l'ovulazione, più del 50-80% delle cellule sono cellule epiteliali cheratinizzate (Verstegen, 1998).

*Figura 3. Citologia vaginale felina. (a) Aspetto tipico dello striscio di una gatta durante la fase estrale: la maggior parte delle cellule sono cellule epiteliali cheratinizzate e cellule con nuclei picnotici. Si osservano anche alcune cellule intermedie. (b) Aspetto tipico di uno striscio vaginale di una gatta alla fine dell'estro: sono visibili cellule epiteliali intermedie e superficiali con numerosi neutrofili. England e Harvey, Manuale di riproduzione e neonatologia dei piccoli animali, BSAVA, 1998.*



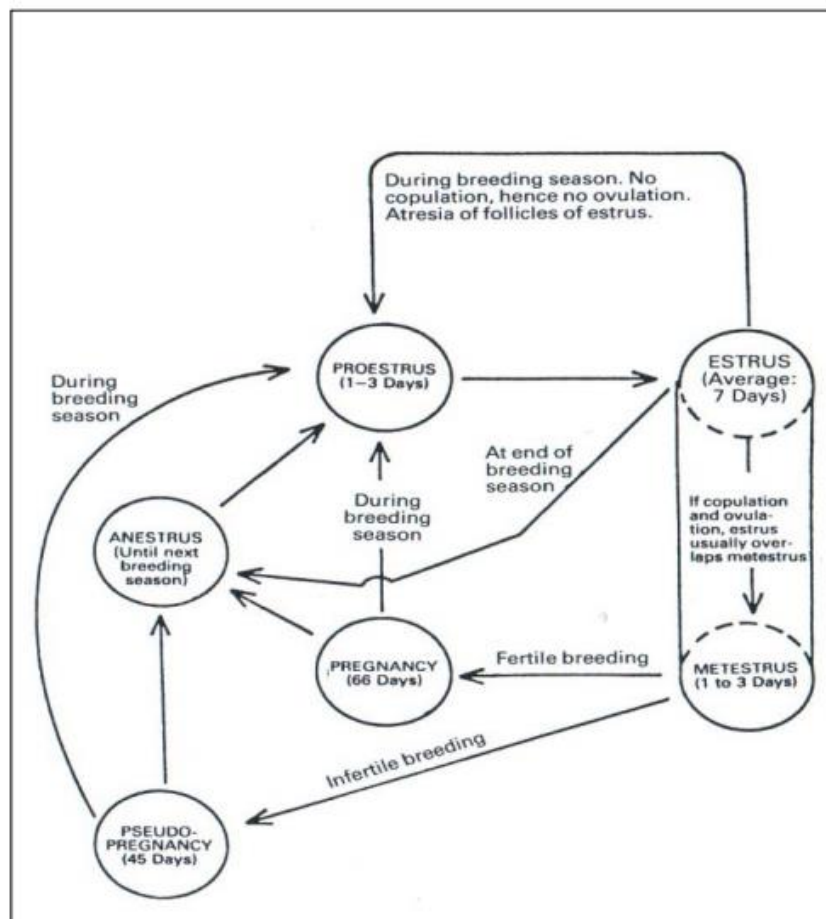
Alla fine dell'estro, nel caso in cui non sia avvenuto l'accoppiamento i follicoli divengono atresici e la concentrazione sierica degli estrogeni si riduce (England, 2010; Verstegen, 1998). In seguito all'atresia dei follicoli, dopo circa 7-8 giorni se ne sviluppano di nuovi, il che corrisponde all'inizio di un nuovo ciclo estrale. In questo caso l'intervallo tra un ciclo estrale e quello successivo si aggira intorno ai 14-19 giorni (Lawler et al.1993).

Nel caso in cui sia avvenuto l'accoppiamento e ci sia stata quindi ovulazione e fecondazione, si vengono a formare i corpi lutei, che restano attivi fino a poco prima del parto. Se invece, pur essendoci stato un accoppiamento, non sia avvenuta la fecondazione, si ha la fase di diestro, in cui i corpi lutei permangono per circa 40 giorni e i livelli ematici di progesterone sono elevati. Al diestro può fare seguito un nuovo ciclo estrale oppure un periodo di inattività ovarica: anestro.

La fase di anestro, che nella gatta è stagionale, è un periodo in cui cessa l'attività ovarica e con essa anche i comportamenti sessuali. In media la sua

durata è di 4-5 mesi, generalmente tra ottobre e febbraio. Durante questa fase si blocca la secrezione di GnRH e di conseguenza di gonadotropine, con conseguente arresto dello sviluppo follicolare. In alcune gatte l'anestro si può osservare anche durante la lattazione, generalmente nel periodo tra il parto e 2-8 settimane dopo lo svezzamento; si crede che questo fenomeno sia legato a un'inibizione nel rilascio ipotalamico di GnRH conseguente allo stimolo della suzione da parte dei gattini (England, 2010).

*Figura 4. Ciclo ovarico della gatta. McDonald, 1989.*



### **1.3 Accoppiamento, ovulazione e fecondazione**

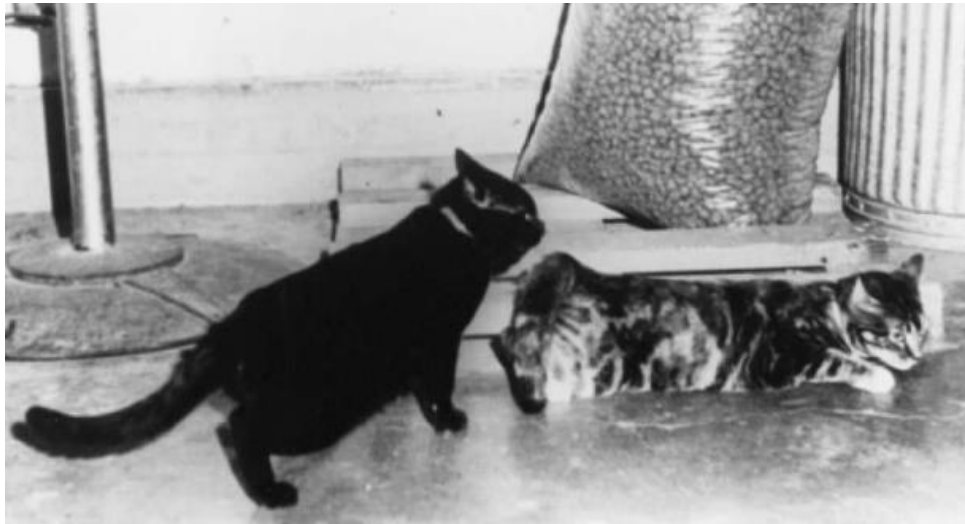
Il comportamento riproduttivo della gatta dipende da più fattori: sia dallo stato ormonale che dall'esperienza sessuale; vi è infatti differenza nella ricezione del maschio in base all'età e all'esperienza della femmina: si è notato come gatte mai andate incontro ad accoppiamento resistessero maggiormente alle attenzioni del maschio al primo coito, mentre fossero più recettive nei rapporti successivi (Christiansen,1987).

A seconda della fase del ciclo estrale in cui la gatta si trova, essa manifesta atteggiamenti diversi: già a partire dal proestro si possono osservare rotolamenti, eventualmente associati a fusa, vocalizzazioni aumentate, strofinamenti su oggetti o emissione di spruzzi di urina, tutte azioni che hanno come fine ultimo l'attrazione del maschio, nonostante in questa fase la femmina non accetti ancora la monta. Durante la fase estrale permangono quegli atteggiamenti di strofinamento e rotolamento, ma la gatta assume anche una postura lordotica, con torace e addome appoggiati al pavimento e zona pelvica sollevata, grazie al posizionamento degli arti posteriori perpendicolarmente al suolo e caudalmente al corpo. Nello stesso momento si ha lo spostamento laterale della coda, che permette quindi l'esposizione della vulva, ulteriore segno di accettazione del maschio (Beaver, 2003).

Durante le successive fasi del ciclo estrale, diestro ed anestro, non si riscontrano invece atteggiamenti particolari come quelli appena descritti e anzi, è possibile che la femmina si dimostri aggressiva qualora un maschio tenti di montarla.

La ragione primaria di queste variazioni comportamentali è l'influenza ormonale svolta degli estrogeni, che raggiungono appunto il loro picco nella fase estrale.

*Figura 5. Postura lordotica in una gatta in estro.*  
*Beaver - Feline behavior: A guide for veterinarians II edizione. Saunders, 2003.*



Dal punto di vista comportamentale – sociale, l'accoppiamento è composto da tre fasi, tendenzialmente rituali: il corteggiamento, l'accoppiamento vero e proprio e la reazione post-coitale. Il corteggiamento consta negli atteggiamenti che sono stati descritti in precedenza, in cui la femmina attira le attenzioni del maschio, o eventualmente di più maschi, che per stabilire il predominio possono lottare tra loro. Successivamente avviene l'accoppiamento propriamente detto, in cui il maschio tenta più volte l'intromissione, per poi afferrare la collottola della femmina tramite un morso non aggressivo, penetrare ed eiaculare nel giro di pochi secondi. Si è stimato che la durata delle fasi appena descritte vada dai 5 ai 50 secondi per afferrare la femmina e montarla, dai 1 ai 30 secondi per introdurre il pene ed eiaculare e dai 0 ai 1 secondi per smontare (Kustritz, 2005). Nel caso in cui la femmina non sia pienamente recettiva, questa si potrebbe rivoltare contro il maschio. Non appena il pene viene estratto, la gatta emette un gemito e si sposta avanti, per poi rotolare su sé stessa e leccare la propria regione vulvare. Questo tipo di grooming può durare dagli 11 ai 95 minuti (Beaver, 2003), pare che possa aiutare la risalita degli spermatozoi e viene visto come

un periodo refrattario, ovvero l'intervallo che si verifica tra i numerosi accoppiamenti che si susseguono. Durante l'estro la femmina si lascia coprire fino a 15-30 volte al giorno.

L'avvenuto accoppiamento, per via della stimolazione della regione vulvo-vaginale e della cervice, porta al rilascio di fattori che stimolano la secrezione ipotalamica di LH, che a sua volta induce l'ovulazione a distanza di 24-50 ore dal primo coito (Christiansen, 1987; McDonald, 1989). Il numero di accoppiamenti influenza molto l'ampiezza degli stimoli che vengono indotti e di conseguenza anche i livelli ematici di LH, oltre che il numero di follicoli che ovulano e quindi di oociti rilasciate. I livelli massimi di LH vengono raggiunti dopo 6-8 accoppiamenti avvenuti nel giro di 2-4 ore e consistono in  $120.5 \pm 23.8$  ng/ml. Tuttavia, non in tutte le gatte l'ovulazione corrisponde all'avvenuto coito, infatti, nel caso in cui la femmina accetti il maschio prima della maturazione dei follicoli, questo non avverrà.

L'ovulazione può essere anche indotta per via iatrogena, tramite stimolazione della cervice per via vaginale, con somministrazione di hCG o con iniezioni di GnRH esogeno.

I livelli di estrogeni calano rapidamente dopo 96 ore dal coito, successivamente alle quali si formano i corpi lutei, con conseguente innalzamento dei livelli di progesterone. Mentre gli estrogeni si mantengono bassi per tutta la durata di un'eventuale gravidanza, il progesterone raggiunge un picco di 15-90 ng/ml dopo 15-25 giorni dall'accoppiamento, per poi rimanere stabile fino al parto, momento in cui invece inizia a calare (Christiansen, 1987; McDonald, 1989).

Una volta depositati nelle vie genitali femminili, gli spermatozoi iniziano la loro risalita, durante la quale avviene la capacitazione. La capacitazione è un processo che avviene nelle tube uterine, in cui l'interazione tra mucosa e spermatozoo induce la rimozione delle proteine del plasma seminale e una glicoproteina di superficie della membrana plasmatica che riveste la regione acrosomiale. Successivamente si ha l'incontro nell'ampolla duttale tra spermatozoo e oocita, che nel frattempo ha completato la sua seconda divisione meiotica.

Nel dettaglio il processo di fecondazione avviene in tre fasi: la penetrazione della corona radiata, la penetrazione della zona pellucida e la fusione delle membrane cellulari.

Durante la penetrazione della corona radiata lo spermatozoo che ha subito il processo di capacitazione è in grado di passare liberamente attraverso le cellule della corona radiata dell'oocita. Nella fase di penetrazione della zona pellucida vi è invece la formazione del legame tra superficie dello spermatozoo e zona pellucida dell'oocita, che dà luogo alla reazione acrosomiale: durante questa reazione, un rilascio di enzimi indotto da proteine zonali fa sì che lo spermatozoo penetri la zona pellucida e si fonda successivamente con la membrana plasmatica, grazie all'azione delle integrine dell'oocita e le disintegrine dello sperma, che si legano tra loro. A questo punto lo spermatozoo è entrato nel citoplasma dell'oocita, dove libera il proprio nucleo, aumentato di dimensioni, così come quello dell'oocita. I due nuclei, denominati ora pronuclei, si fondono, con unione dei due corredi cromosomici. Con il ripristino del corredo cromosomico diploide si viene a formare lo zigote, che porta materiale genetico materno e paterno.

In base alla presenza di cromosoma X o Y portato dallo spermatozoo, vi sarà la distinzione in genere maschile o femminile.



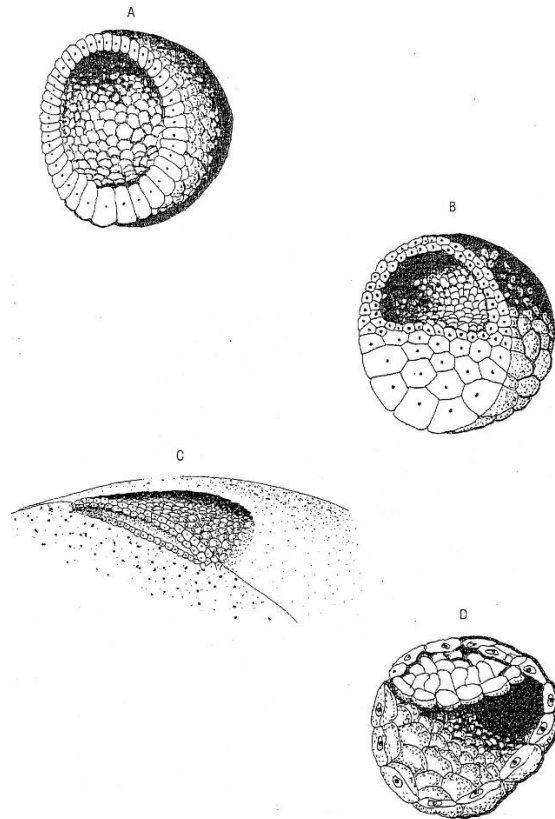
## 1.4 Embriogenesi

Successivamente alla formazione dello zigote inizia il processo di segmentazione, ovvero un processo in cui una serie di divisioni mitotiche divide il citoplasma della cellula uovo in diverse cellule più piccole, chiamate blastomeri (Pelagalli, 2014). Questi aumentano di numero man mano che il processo mitotico procede. Il volume dei blastomeri resta inizialmente invariato, con un aumento del volume solamente alla fine della segmentazione. Nella parte iniziale di questo processo i blastomeri risultano solo lassamente uniti tra loro, mentre il legame diviene più solido al momento della compattazione, che avviene col raggiungimento di 8 blastocisti. A questo punto si ha la formazione di una struttura sferica e compatta, che prende il nome di morula.

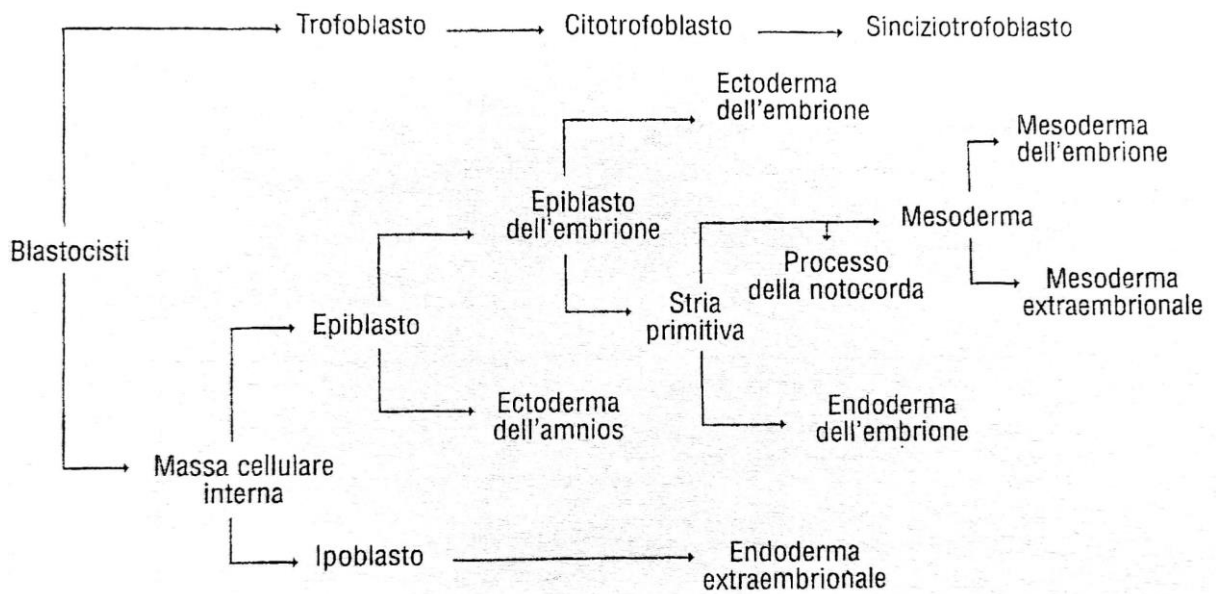
La morula è una struttura appunto sferica, formata da 16-30 cellule, che risultano più appiattite nelle zone periferiche e globose centralmente. La parte centrale può essere chiamata embrioblasto, in quanto successivamente darà luogo all'embrione, mentre le cellule appiattite periferiche formeranno il cosiddetto trofoblasto. Il trofoblasto è una struttura considerata come il primo annesso embrionale a formarsi, la sua funzione sarà quella di fornire nutrimento allo zigote (Barone, 2009). La morula è poi soggetta a successive divisioni cellulari, che la portano a trasformarsi in blastocisti verso l'11° giorno di gestazione nella gatta (Mastronardi, 1980).

La blastocisti è una struttura composta da 32 cellule che ha subito alterazioni nell'orientamento delle cellule, che tra le altre cose porta alla formazione di una cavità ripiena di liquido chiamata blastocele.

**Figura 6. Schema dei diversi tipi di blastocisti. A) Anfiosso B) Anfibio C) Rettili e uccelli D) Mammifero. Pelagalli, 2014.**

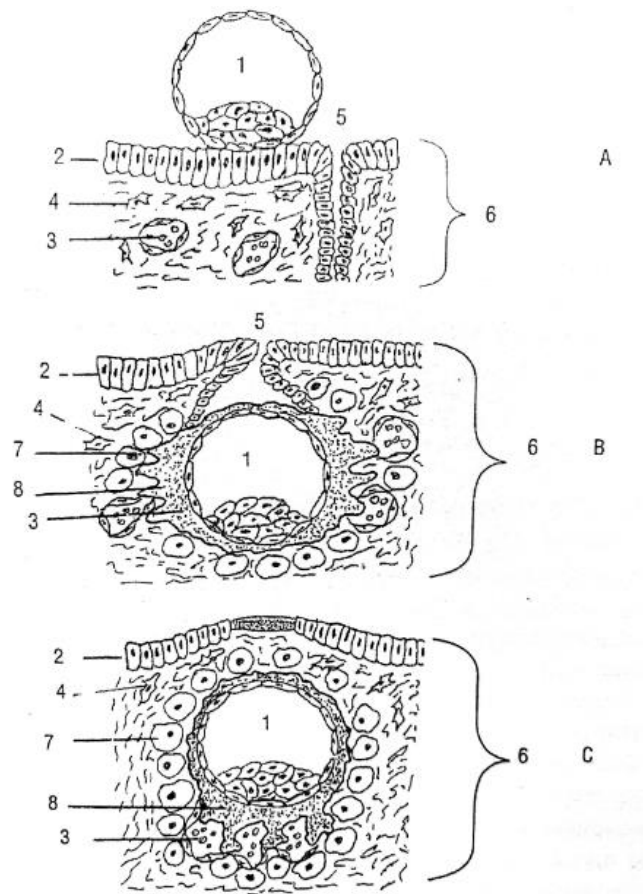


**Figura 7. Schema della derivazione dei vari tessuti in embrioni di mammiferi. Pelagalli, 2014.**



Durante i processi di segmentazione l'embrione si porta dalle tube uterine all'utero, grazie alla contrazione della parete delle tube e al movimento creato dalle ciglia poste sulla parete. Inizialmente a livello uterino l'embrione rimane libero nel lume, dove aumenta di volume assorbendo fluidi presenti a questo livello. Poco dopo le cellule del trofoblasto entrano in contatto con la mucosa uterina, dando luogo all'impianto della blastocisti nella parete, nella gatta questo avviene al 12°-13° giorno di gestazione ed è centrale, ovvero caratterizzata dal fatto che la blastocisti, una volta raggiunto l'utero, si espande e si differenzia in modo tale che la componente extraembrionale si giustapponga all'epitelio uterino. Questo processo è mediato dall'azione di ormoni come estrogeni e progesterone, responsabili della proliferazione delle cellule endometriali e della secrezione ghiandolare uterina. Il risultato della secrezione ghiandolare è un fluido chiamato latte uterino, che la blastocisti utilizza per il proprio nutrimento nelle fasi appena successive all'impianto.

*Figura 8. Diverse modalità di impianto della blastocisti in utero. A) Impianto centrale B) Impianto eccentrico C) impianto interstiziale 1. Blastocisti 2. Epitelio uterino 3. Vasi uterini 4. Fibroblasti 5. Cripte 6. Mucosa uterina 7. Cellule deciduali 8. Sincizio trofoblasto 9. Tappo di coagulo. Pelagalli, 2014*



Alla segmentazione segue la gastrulazione, il processo in cui, tramite movimenti morfogenetici, si vengono a formare i tre foglietti embrionali: ectoderma, mesoderma ed endoderma. A partire dai foglietti embrionali vi sarà successivamente la formazione dei vari organi fetali.

L'endoderma deriva dal rivestimento interno della blastocele da parte di cellule denominate ipoblasto o foglietto profondo, provenienti dalla parte inferiore della massa cellulare interna della blastocisti.

Le cellule provenienti invece dalle parti superficiali della blastocisti concorrono alla formazione dell'epiblasto, suddiviso in epiblasto embrionale e foglietto epiblastico dell'amnios.

Tra i due foglietti, ipoblastico ed epiblastico, migrano le cellule precursori del mesoderma, espandendosi in tutta l'area disponibile, ad eccezione delle estremità buccale e cloacale, poste rispettivamente cranialmente e caudalmente nel disco embrionale.

Le cellule dell'epiblasto formano, nelle vicinanze di un'area chiamata nodo di Hansen, la placca precordale e la notocorda, sostegno assiale primitivo dell'embrione, che regredirà una volta raggiunto lo sviluppo completo, limitandosi al nucleo polposo dei dischi intervertebrali.

Seguono ulteriori modificazioni dei foglietti embrionali, che permettono la formazione di abbozzi di organi embrionali.

Dall'ectoderma si formano il sistema nervoso, gli organi di senso, cute e annessi cutanei. Dal mesoderma si differenzia invece la maggior parte dei tessuti di sostegno, i tratti urogenitali e il sistema cardiovascolare. Dall'endoderma si formano l'apparato respiratorio, la vescica, la cavità timpanica e la tuba uditiva (Pelagalli, 2014).

*Figura 9. Fasi dello sviluppo fetale correlati al periodo gestazionale nella gravidanza della gatta. Pieri, Souza et al., 2015.*

<b>Sviluppo embrionale</b>	<b>Giorni di gestazione</b>	<b>Lunghezza del cordone ombelicale (cm)</b>
Sviluppo del sacco vitellino	21	6-7
Comparsa della stria primitiva	21	
Formazione della placca neurale	21	
Abbozzi del cuore	21-22	
Formazione completa della notocorda	22-25	10-17
Intestino primitivo	22-25	
Demarcazione dei solchi ottici e dei bulbi oculari	22-25	
Sviluppo precoce degli arti anteriori e posteriori	22-25	
camere cardiache	22-25	
Vescicole cerebrali	22-25	
Apparato respiratorio primitivo	22-25	
Mesonefro primitivo	22-25	
Coda e testa	27	20
Cavità orale, lingua, esofago trachea	27	
Apparato respiratorio completo	28-32	22-30
Apparato urogenitale	28-32	
Apparato cardiovascolare completo	32	30-35
Retina	32	
Differenziazione degli organi genitali	35	
Sviluppo completo del feto	35	

*Figura 10. Embrione felino alle varie fasi di gestazione in cui è possibile identificare le diverse strutture embrionali. L'età gestazionale è determinata in giorni. 1) notocorda. 2) doccia neurale. 3) abbozzo del cuore. 4) annessi embrionali. 5) somiti. 6) bulbi oculari pigmentati. 7) tratto urogenitale con abbozzi renali. 8) arti. 9) tubo neurale. 10) mandibola. 11) arco faringeo. 12) intestino primitivo. 13) apparato respiratorio. 14) processo nasale. 15) mielencefalo. Pieri, Souza et al., 2015.*

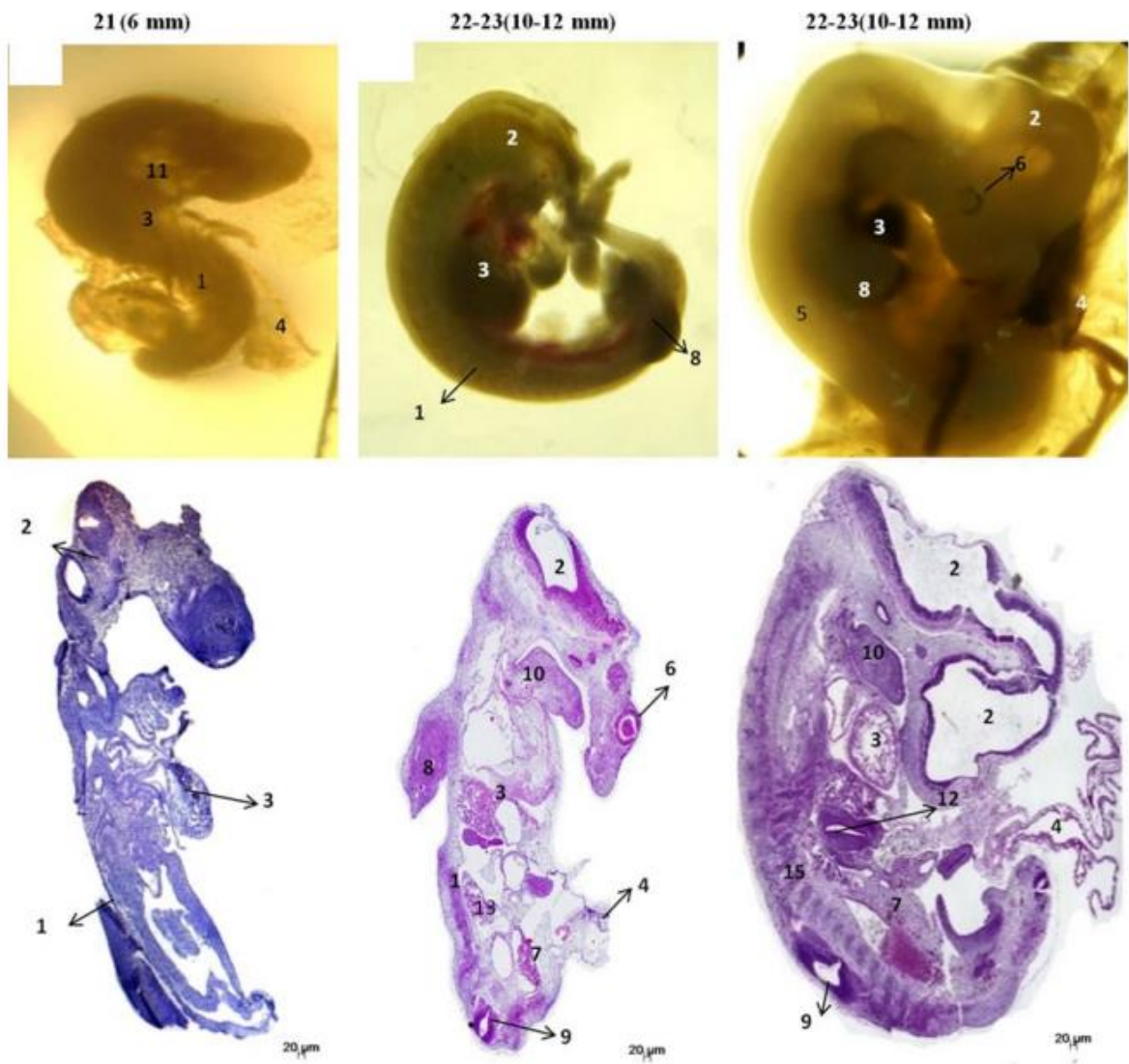
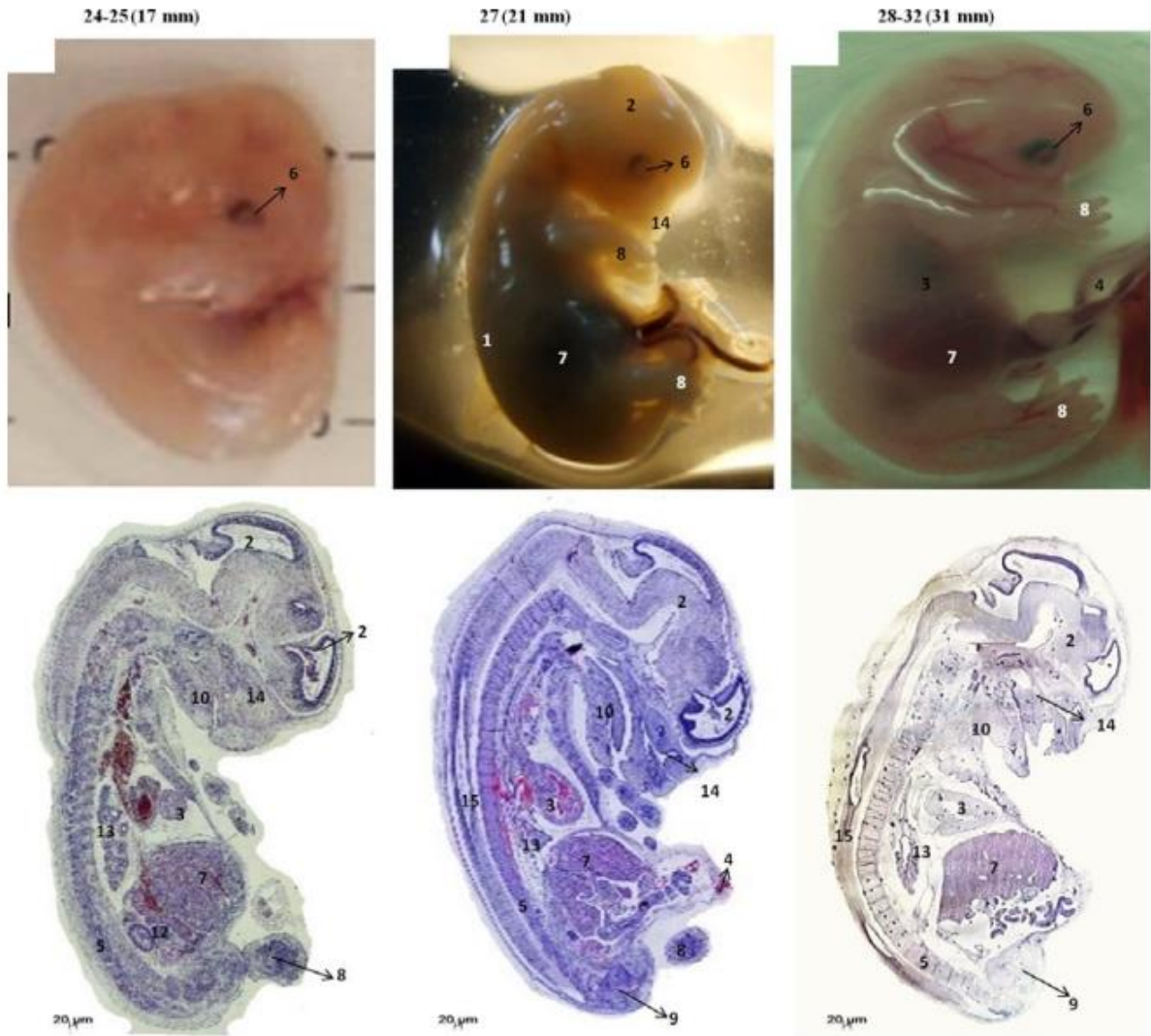


Figura 11. Continuo della figura precedente.



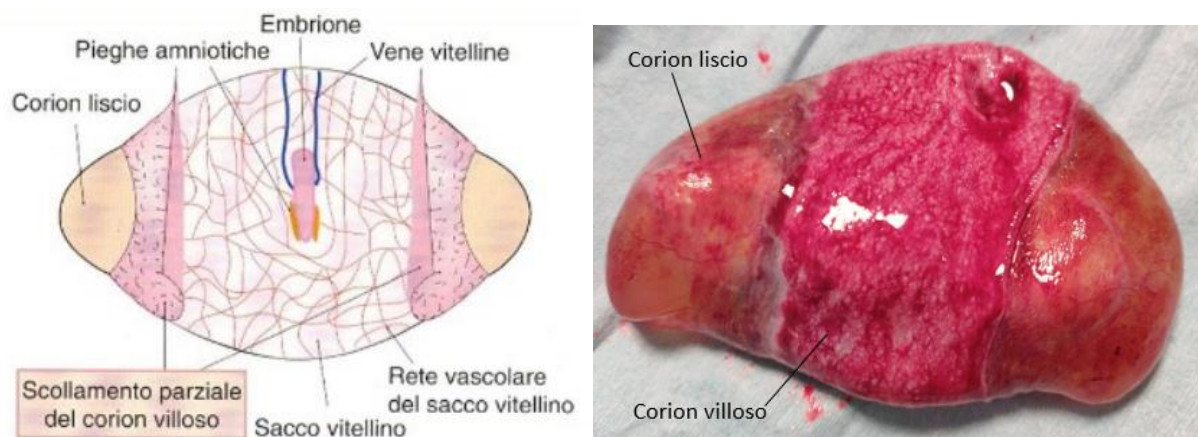


## 1.5 Sviluppo degli annessi fetali

Gli annessi fetali, derivanti dal trofoblasto, sono corion, amnios, allantoide, cordone ombelicale, sacco vitellino e placenta. Di questi il corion e l'amnios sono dei veri e propri involucri, il primo più esterno e il secondo più interno a racchiudere inizialmente l'embrione ed in seguito il feto. Il sacco vitellino e l'allantoide, invece, sono vescicole unite all'embrione grazie al cordone ombelicale. Infine, la placenta è l'insieme di corion e mucosa uterina (Barone, 2009).

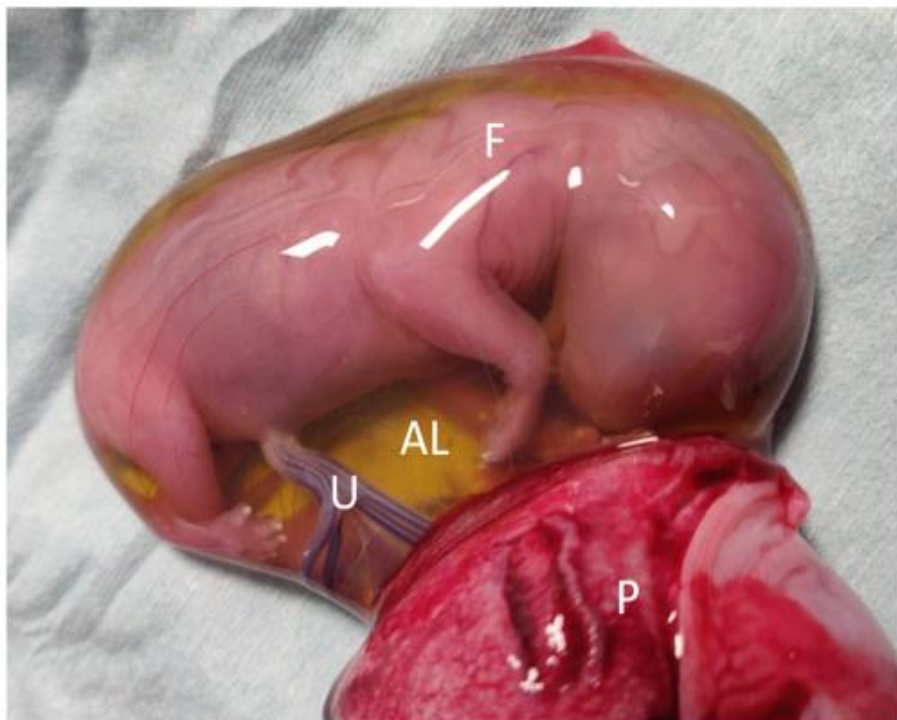
Analizzando singolarmente ciascun annesso fetale, si può dire che il corion si forma precocemente, a partire dal trofoblasto. Il trofoblasto si divide in due strati cellulari: il citotrofoblasto e il sinciziotrofoblasto, per poi essere rivestito internamente dal mesoblasto. Trofoblasto e mesoblasto concorrono alla formazione del corion, che si rapporta con l'amnios e l'allantoide sottostanti (Barone, 2009). Sulla faccia esterna del corion si sviluppano dei villi, su cui corrono le ramificazioni vascolari che si dipartono dal cordone ombelicale.

*Figura 12. Rappresentazione grafica della vescicola embrionale ricoperta dai relativi annessi, a sinistra. Placenta di gatta dopo rimozione chirurgica, a destra. Prof. Bigliardi, sezione di Clinica Ostetrica, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma.*



L'amnios deriva dall'epiblasto, è rivestito internamente dal mesoblasto e la sua parete si congiunge con la cute del feto, riflettendosi sul cordone ombelicale. Nella gatta, come nella maggior parte dei mammiferi domestici, la formazione dell'amnios avviene per pieghettamento. In questo processo l'embrioblasto si appiattisce, assumendo una forma discoidale, i cui margini si sollevano formando delle pieghe, che si uniscono dorsalmente in maniera progressiva al disco embrionale, per poi avvolgere l'embrione. Le pieghe si saldano successivamente chiudendo quindi del tutto la cavità amniotica (Barone, 2009).

*Figura 13. Escissione di una vescicola embrionale, in cui sono ben visibili il feto (F), il cordone ombelicale (U), la placenta (P) e il sacco allantoideo (AL) contenente fluido giallastro.*  
Bigliardi et al., 2022.



L'allantoide è un annesso fetale che compare precocemente a partire da un ispessimento mesoblastico situato nell'estremità caudale del disco embrionale, chiamato cercine allantoideo. L'allantoide si allarga,

estendendosi nel celoma extraembrionale, dando luogo alla formazione di una vescicola unita all'embrione tramite il cordone ombelicale, con cui è in contatto mediante un peduncolo, chiamato peduncolo allantoideo.

L'allantoide supporta la circolazione ombelicale e persiste fino al parto avvolgendo completamente l'amnios e tenendolo sospeso (Barone, 2009).

*Figura 14. Feto felino in cui sono visibili cordone ombelicale e allantoide. Prof. Bigliardi, sezione di Clinica Ostetrica, dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma.*

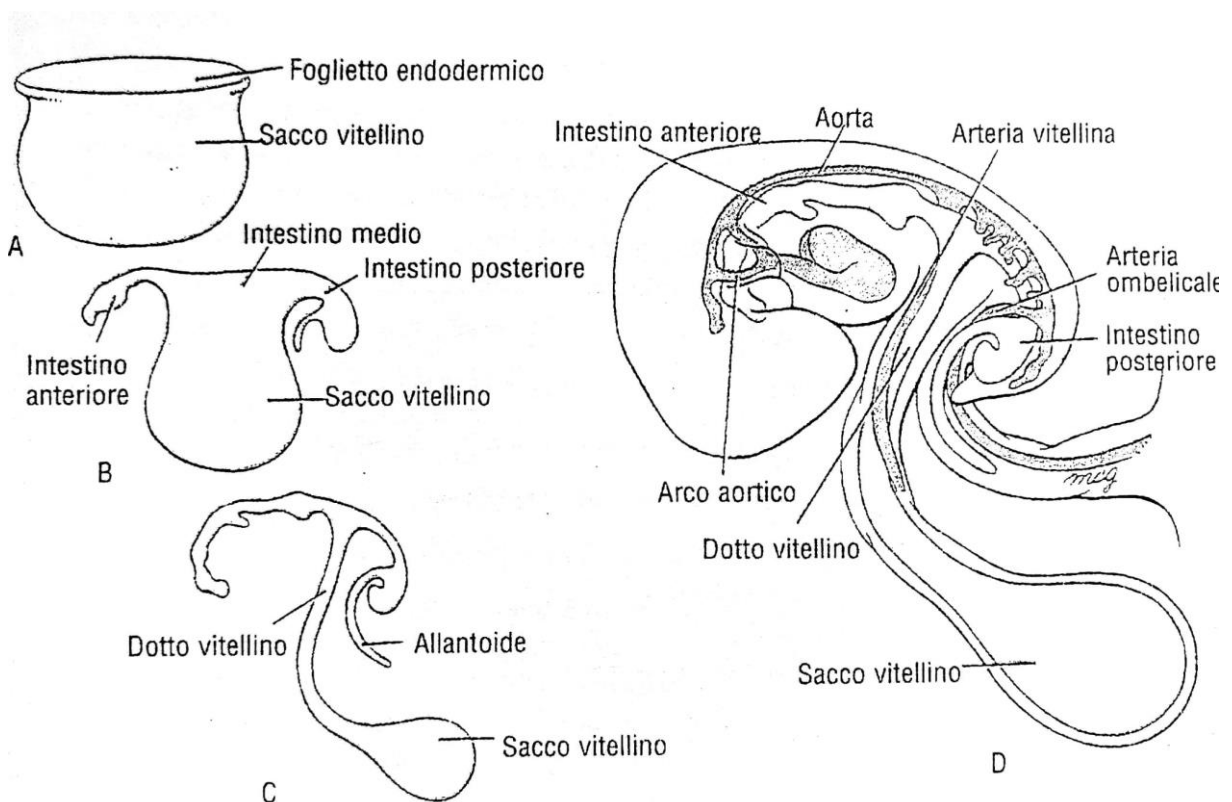


Il cordone ombelicale ha la funzione di collegare l'embrione con i relativi annessi, ma soprattutto di permettere lo scambio di sostanze tra la madre e il feto; proviene dal sollevamento dell'embrione sul sacco vitellino, con la comparsa di pieghe del corpo, che permettono di formare una strozzatura tra l'embrione e gli annessi e tra il celoma intra-embriionale e quello extra-embriionale. Questa strozzatura appare ampia all'inizio, per poi allungarsi e restringersi a dare il cordone ombelicale vero e proprio. All'interno del

cordone ombelicale vi è il passaggio del condotto vitellino e del condotto allantoideo, che portano ognuno i rispettivi vasi (Pelagalli, 2014).

Il sacco vitellino si forma precocemente, a partire dall'endoblasto extraembrionale. Nelle prime fasi è un annesso alquanto voluminoso rispetto all'embrione, ma il suo accrescimento cessa poco dopo. Sempre nelle prime fasi della gestazione si ha la formazione di peduncoli, in particolare il peduncolo vitellino che persiste fino alla nascita, permette il collegamento del sacco vitellino con il tratto intestinale dell'embrione (Barone, 2009).

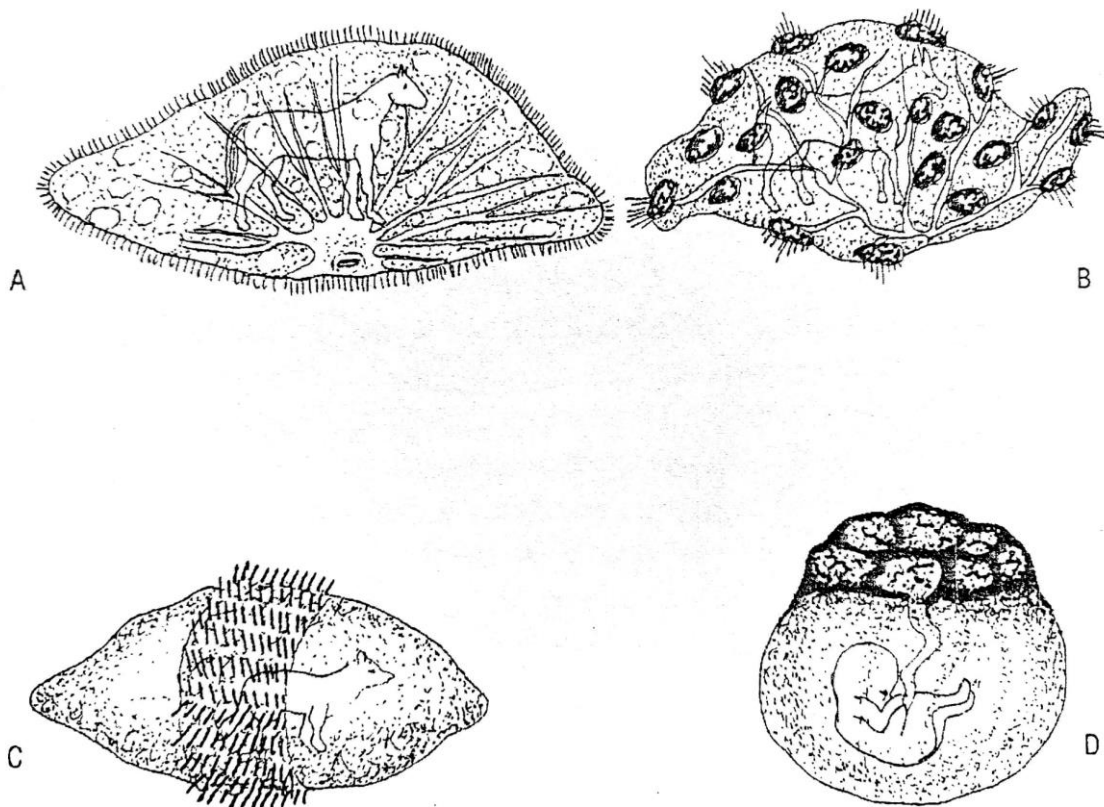
*Figura 15. Sviluppo del sacco vitellino. Pelagalli, 2014.*



La placenta è una struttura formata dall'associazione di corion e mucosa uterina, che sono rispettivamente la componente fetale e la componente materna. La funzione della placenta è quella di permettere scambi metabolici e respiratori tra madre e feto. Tramite la barriera placentare viene impedito

il passaggio al feto di sostanze lesive o microorganismi, fungendo così anche da struttura protettiva. La placenta dei carnivori, quindi anche della specie felina, è definita allantoidea, in quanto l'allantoide si espande nel celoma extra-embryonale, entrando in contatto con la somatopleura del corion. Viene definita inoltre zonata, in quanto la distribuzione dei villi avviene in una parte limitata della superficie del corion, in particolare si forma un anello che avvolge la zona centrale del corion, mentre ai poli l'assenza di villi fa sì che vi sia invece un corion liscio.

*Figura 16. Rappresentazione dei vari tipi di placenta in base alla distribuzione dei villi sul corion. A) Placenta diffusa B) Placenta cotiledonare C) Placenta zonata D) Placenta discoidale. Pelagalli, 2014.*



Inoltre, la placenta dei carnivori può essere definita come endotelio-coriale, per via del fatto che i villi del corion erodono l'epitelio della mucosa uterina, oltre che il tessuto connettivo sottostante, prendendo quindi rapporto con l'endotelio dei vasi materni, da qui endotelio-coriale. Le placente endotelio-coriali sono caratterizzate dal fatto che, durante il secondamento, con il distacco del corion vi può essere anche l'espulsione della mucosa uterina, definita decidua, il che fa sì che la placenta sia definita come deciduata (Pelagalli, 2014).

## **1.6 Sviluppo dei liquidi fetali**

I liquidi fetali iniziano a formarsi molto precocemente, infatti già nella blastocisti le cellule del trofoblasto secernono un liquido, racchiuso all'interno del blastocele. Questo liquido primordiale è composto da acqua e metaboliti cellulari provenienti dal trofoblasto, che contribuiscono alla formazione di un substrato nutritivo del bottone embrionale (Shindler, Pendzialek et al., 2020).

Successivamente, con la formazione dell'amnios, vi è anche la formazione del liquido amniotico, che deriva principalmente dalle secrezioni provenienti dalla cavità orale e dal resto dell'apparato gastroenterico, dal tratto respiratorio e dalla cute prima della sua cheratinizzazione. Una piccola parte di questo liquido viene ingerita dal feto, mentre un'altra piccola parte passa al circolo sanguigno fetale per gradiente osmotico e grazie anche all'azione di acquaporine presenti su alcune membrane fetali (Aralla, Mobasheri et al. 2012).

Il liquido allantoideo deriva nelle prime fasi della gestazione dal trasporto di membrana di sostanze e dalle secrezioni emesse dalle membrane extraembrionali, nelle fasi successive proviene invece dalle secrezioni renali, dal mesonefro e dal metanefro, che lo rendono quindi abbastanza simile a urina fetale. Quest'ultima, nelle fasi finali della gravidanza viene invece riversata attraverso l'uretra nel sacco amniotico (Fresno, Rodriguez et al, 2012).

## 1.8 Diagnosi di gravidanza

La determinazione dello stato di gravidanza e la valutazione dell'età gestazionale possono essere svolte con l'utilizzo di varie metodiche: esistono una valutazione ecografica, una valutazione radiologica e una valutazione macroscopica. Test di laboratorio che vengono di norma utilizzati per la diagnosi di gravidanza degli altri mammiferi domestici, non possono essere ancora applicati nella gatta (Zambelli e Prati, 2006).

La valutazione macroscopica si basa principalmente sulla palpazione, in particolare la palpazione addominale. Questa è una metodica che si può applicare però dal 21° giorno di gravidanza in poi, in quanto nella fase precedente le vescicole embrionali sono troppo piccole per essere apprezzate e l'unico riscontro che si può avere, intorno al 17° giorno, è l'aumento del tono dell'utero. Al 55° giorno è possibile palpare i diversi feti, in particolare le teste, ma è solo al 58° giorno che si possono contare con più accuratezza i feti (Levy e England, 2010).

Oltre alle informazioni relative alla palpazione addominale, si possono apprezzare visivamente anche una serie di alterazioni fisiche della gatta: c'è un aumento di peso, con l'addome che aumenta progressivamente il proprio volume, assumendo una forma sempre più tondeggiante, inoltre i capezzoli aumentano di dimensioni e a partire dal 21° giorno di gestazione questi subiscono un arrossamento. Dal 58° giorno aumentano di volume anche le mammelle, in preparazione all'allattamento (England, 1998; Gruffydd-Jones, 2004; Levy e England, 2010).



*Figura 17. Tumefazione ed arrossamento del capezzolo in gatta gravida al 40° giorno di gestazione. Prof. Bigliardi, sezione di Clinica Ostetrica, dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma.*

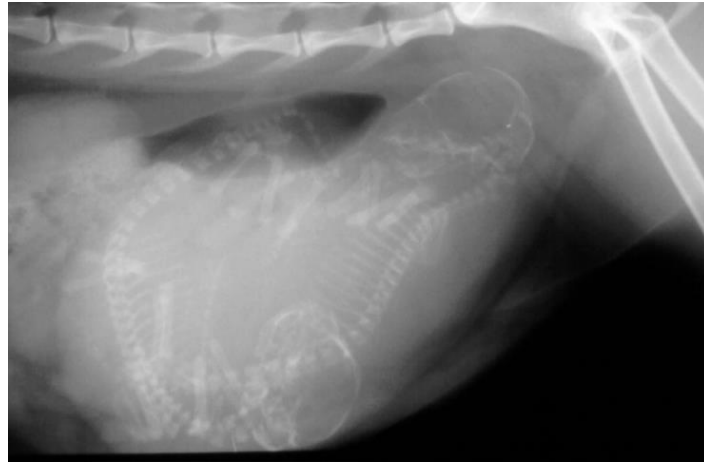


Il metodo radiografico viene applicato più che altro per determinare il numero di feti presenti, mentre per la diagnosi di gravidanza è meno utilizzato, per via del fatto che è necessario attendere la mineralizzazione scheletrica del feto per la sua visualizzazione radiografica, si attende infatti il 40° giorno (Root e Kustritz, 2006). Perciò, nonostante la sua attendibilità nell'ultimo terzo della gravidanza sia del 100%, si preferisce utilizzare la metodica ecografica, meno accurata, ma decisamente più precoce. Il rischio legato alle radiazioni sul feto è pressoché nullo nella fase finale della gravidanza, mentre nel primo terzo potrebbe andare ad alterare l'organogenesi (Levy e England, 2010).

*Figura 18. Stima del giorno di gestazione in relazione alla mineralizzazione dei vari segmenti ossei. England e Von Heimendhal, 2013.*

<b>Giorno di gestazione</b>	<b>Segmenti ossei mineralizzati</b>
Dal 38°-40°	Ossa del cranio, scapola, omero, femore, vertebre e coste
Dal 43°	Ileo, ischio, tibia, perone
Dal 49°	Metatarsi e metacarpi
Dal 52°-53	Sterno e falangi
Dal 56°-63°	Denti molari

*Figura 19. Immagine radiografica, con approccio latero-laterale, di gatta gravida. Si possono osservare due feti ossificati. Prof. Bigliardi, sezione di Clinica Ostetrica, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma.*



La tecnica ecografica è una metodica sicura, non invasiva e poco costosa, che permette di eseguire diagnosi precoce di gravidanza già dal decimo giorno post accoppiamento, seppur con una certa difficoltà. Permette anche di valutare la vitalità fetale, stabilire l'età gestazionale, individuare eventuali anomalie e determinare il sesso e il numero dei feti, quest'ultimo parametro con minor precisione però rispetto all'esame radiografico (Zambelli e Prati, 2006). Al 10° giorno a partire dall'accoppiamento si rende visibile la camera gestazionale (Zambelli et al., 2002), inizialmente piccola, anecogena e circolare, che successivamente cresce in modo progressivo: in 30 giorni passa dai 6,9 ai 35,7 mm. Al suo interno contiene il sacco vitellino.

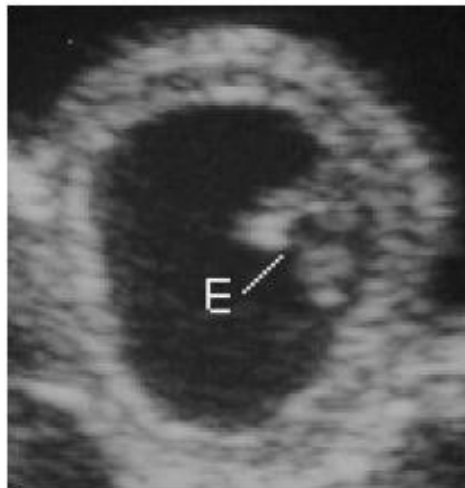
*Figura 20. Camera gestazionale (C) in feto di 10 giorni. Zambelli e Prati, 2006.*



Verso il 14° giorno si può individuare precocemente l'embrione, che risulta come un ispessimento della parete della camera gestazionale, al 16° giorno è possibile invece visualizzare l'embrione come protrusione iperecogena all'interno della camera gestazionale, ed è inoltre possibile identificare la placenta, struttura caratterizzata da due linee iperecogene separate da una linea ipoecogena. Inizialmente l'ipoecogenicità è dovuta alla presenza di endometrio iperplastico, mentre successivamente è legata allo sviluppo della vascolarizzazione locale.

Al 17° giorno il feto si stacca in modo completo dalla parete della camera gestazionale, restando però ancora in prossimità della stessa. L'aspetto fetale non è in questo stadio ancora ben definito, ma inizia ad acquisire la caratteristica forma curvilinea a C.

*Figura 21. Embrione (E) al 17° giorno di gestazione, appare separato dalla parete della camera gestazionale. Zambelli e Prati, 2006.*



La forma a C si riscontra meglio già al 18° giorno, in cui sono visibili anche le gemme della testa, del tronco e degli arti toracici, strutture che appaiono iperecogene. Sempre al 18° giorno si riscontra che il sacco vitellino ha

assunto una posizione ventrale all'embrione, mentre caudalmente si ha l'allantoide, che appare come una piccola area circolare anecogena.

Al 20° giorno la camera gestazionale, il cui diametro è aumentato progressivamente, assume la classica forma di limone (che dal 45° giorno diventerà invece cilindrica). In questo periodo si ha anche lo sviluppo dell'allantoide, mentre l'embrione resta ancora ripiegato su se stesso, muovendosi però verso il centro della camera gestazionale. Il sacco vitellino e l'allantoide raggiungono le stesse dimensioni e diventa visibile anche l'amnios, che appare come una piccola area anecogena.

Al 22° giorno l'embrione si va a collocare nelle vicinanze della parete opposta, mentre il sacco vitellino diviene più piccolo dell'amnios, ponendosi ventralmente a quest'ultimo. Il resto della camera gestazionale risulta occupato dall'allantoide.

Al 25° giorno è possibile riconoscere il carattere zonato della placenta, che va ad occupare l'intera superficie della camera gestazionale, ad eccezione dei poli, che mantengono lo stesso aspetto per il resto della gravidanza.

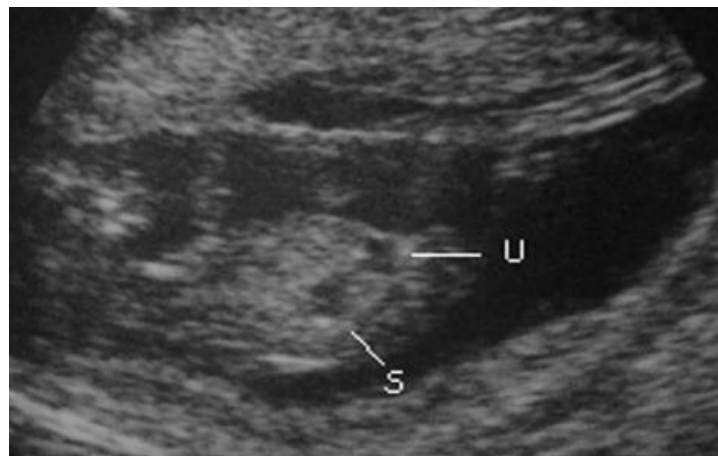
*Figura 22. Feto al 25° giorno di gestazione in sezione trasversale. Prof. Bigliardi, sezione di Clinica Ostetrica del dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie dell'Università di Parma.*



Dal 26° giorno l'embrione assume la sua forma definitiva, con il suo asse maggiore parallelo a quello della camera gestazionale e di conseguenza anche del corno uterino.

Al 30° giorno si riescono a riconoscere gli organi fetali, con la conseguente possibilità di individuare eventuali malformazioni fetali (Zambelli e Prati, 2006). Si visualizzano una struttura dorsale, sagittale e tubulare, con una parete iperecogena e contenuto anecogeno che corrisponde ad un primitivo tubo neurale. Nella testa si possono riscontrare un'area anecogena, che corrisponde alla vescicola encefalica primitiva e delle aree iperecogene, riscontrabili anche negli arti toracici, che indicano la presenza di gemme di alcune ossa facciali, oltre che le diafisi delle ossa lunghe negli arti toracici. Dal 29° al 30° si rende visibile vicino al cordone ombelicale e cranialmente agli arti pelvici la vescica urinaria, che si presenta come un'area anecogena puntiforme. Dopo il 30° giorno si possono visualizzare altre strutture come il cuore, il fegato e i polmoni, che in precedenza non erano distinguibili tra loro per via di un'omogeneità nella loro ecogenicità, legata al grande contenuto di acqua presente negli organi in crescita, ma anche alla presenza di grasso e dei grossi vasi.

*Figura 23. Feto al 30° giorno di gravidanza, sono visibili alcuni organi, tra cui la vescica urinaria (U) e lo stomaco (S). Zambelli e Prati, 2006.*



Il periodo tra il 28° e il 35° giorno post accoppiamento è il momento migliore per un eventuale conteggio dei feti, fermo restando che la metodica radiografica risulta quella più precisa, principalmente per il fatto che durante una radiografia viene eseguito un fermo immagine, al contrario dell'ecografia, in cui i feti e la madre possono spostarsi, impedendo o comunque falsando il conteggio. L'esame dell'utero volto ad individuare tutti i feti viene di norma eseguita partendo dalla biforcazione dell'utero, valutando prima un corno uterino e successivamente il controlaterale, procedendo caudo-cranialmente (Nyland e Mattoon, 1995).

Dopo il 30° giorno il sacco vitellino diventa meno visibile, per poi scomparire ecograficamente in modo definitivo al 40° giorno.

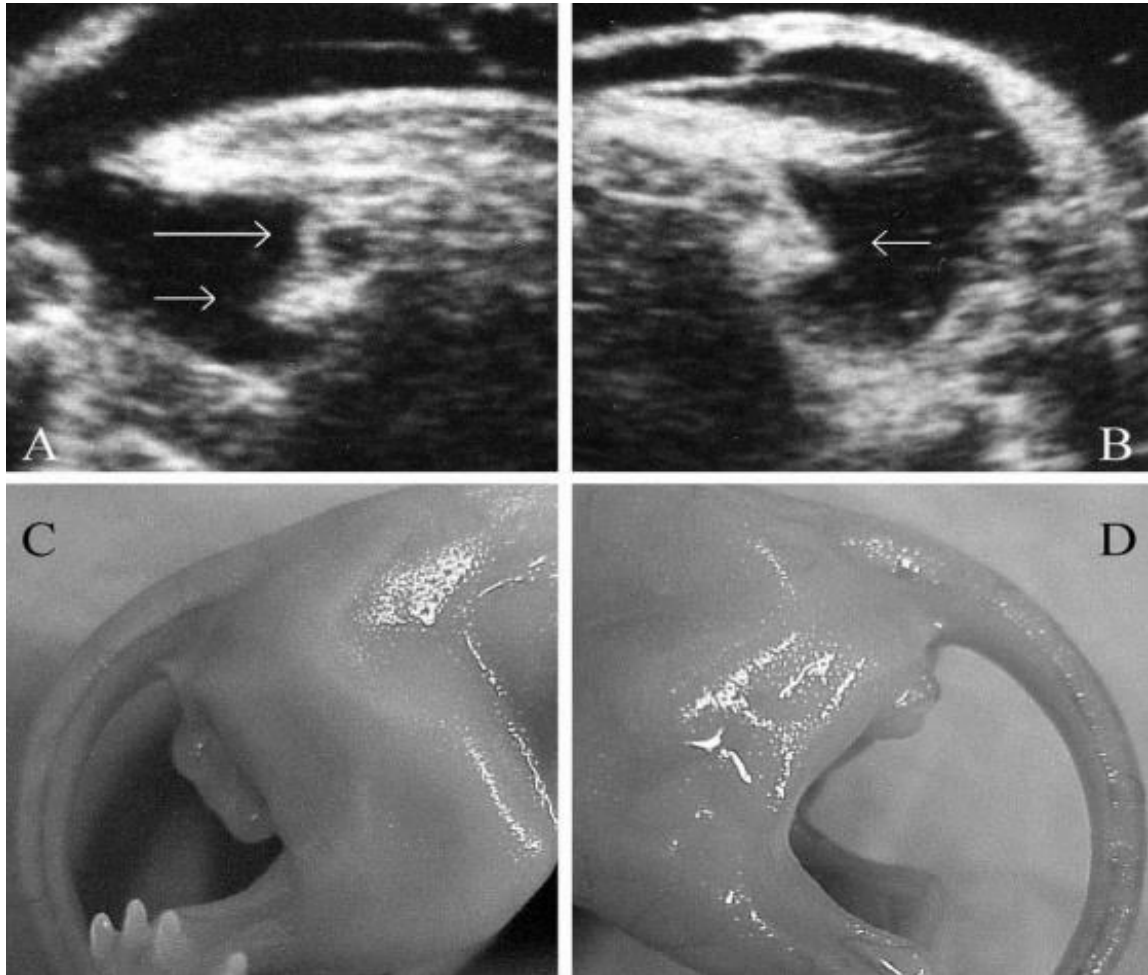
Dal 33° giorno in poi si possono apprezzare i movimenti fetali, che diventano però più evidenti dal 37° giorno, in cui si potranno vedere movimenti di estensione e flessione di testa, collo e arti.

Al 35° giorno si possono visualizzare i cuscinetti dei piedi, mentre compaiono a livello della testa due aree anecogene circolari: gli occhi (Zambelli et al., 2002).

Tra il 38° e il 43° giorno è possibile determinare il sesso dei feti (fig. 24) e questo risulta il momento migliore in quanto successivamente la coda aderisce in modo maggiore agli arti posteriori e diminuiscono i fluidi fetali intorno al perineo, rendendo questa zona meno facile da indagare (Zambelli e Prati, 2006).

Dal 39° giorno si vedono per la prima volta ventro-lateralmente alla colonna vertebrale i reni, che appaiono ellittici e isoecogeni al fegato.

*Figura 24. Determinazione ecografica del sesso fetale. A: Ecografia dei genitali esterni di un feto maschio di 40 giorni in sezione sagittale. Si vedono il prepuzio (freccia corta) e lo scroto (freccia lunga). B: Ecografia dei genitali esterni di feto femmina di 41 giorni in sezione sagittale. C: aspetto dei genitali esterni di feto maschio di 43 giorni fissato in formalina. D: Aspetto dei genitali esterni di feto femmina di 43 giorni fissato in formalina. Zambelli et al., 2004.*



Dal 40° giorno si riescono a distinguere le vertebre, il piccolo e il grande intestino e il plesso coroideo cerebrale.

Al 42° giorno tutte le ossa diventano iperecogene, in particolare le diafisi, mentre le epifisi restano ipoecogene per tutta la gravidanza. In questo periodo si rendono più visibili le pareti dei grossi vasi, tra cui quelli ombelicali che si dirigono al fegato.

Dal 45° giorno si può visualizzare l'amnios solamente eseguendo una scansione tra i due arti, tra la testa e gli arti pelvici o tra la testa e gli arti toracici.

Al 50° giorno si possono distinguere le lenti del cristallino, che appaiono come due strutture iperecogene all'interno degli occhi, in posizione rostrale. Si possono anche distinguere le singole camere cardiache, il diaframma, la differenza tra corticale e midollare renale e i movimenti di lingua, bocca e diaframma. Il fluido allantoideo si vede solo in piccole aree intorno al feto.

Al 54° giorno si può valutare la stratificazione della parete intestinale.

Al 55° giorno si possono visualizzare delle piccole strutture mobili all'interno dell'amnios, che corrispondono probabilmente a meconio.

(Zambelli et al., 2002)



Figura 25. Tempi di apparizione ecografica e conseguente sviluppo di alcune strutture fetali ed extrafetali durante i primi 30 giorni di gravidanza della gatta. Zambelli et al., 2002.

		media	range
Camera gestazionale	Forma sferica	10	10-11
	Forma a limone	20	19-21
Parete uterina	Endometrio ipoecogeno	4	3-5
	Placenta stratificata	16	15-17
	Placenta zonata	25	24-26
Posizione dell'embrione	Sulla parete della camera gestazionale	14	13-16
	Sporgente dalla camera gestazionale	16	15-17
	Separato dalla parete della camera	17	16-18
	Al centro della camera	20	19-21
	Asse dell'embrione parallelo all'asse del corno	26	25-28
Membrane fetali	Sacco vitellino	10	10-11
	Allantoide	18	17-19
	Sacco vitellino ed allantoide di pari dimensioni	20	19-21
	Amnios	20	20-21
	Amnios e sacco vitellino di pari dimensioni	25	24-25
	Sacco vitellino di forma tubulare	25	25-27
Embrione e feto	Cuore che batte	16-17	16-18
	Forma a C	18	17-19
	Gemme degli arti toracici	18	17-19
	Forma definitiva	26	24-27
	Tubo dorsale sagittale	30	26-30
	Area anecogena a livello della testa	30	26-30
	Stomaco (puntiforme)	30	29-30
	Vescica (puntiforme)	29-30	29-32
	Polmoni iperecogeni vs fegato	30	29-32
	Cordone ombelicale	30	30-32
	Scheletro iperecogeno (ossa lunghe, arti ant, e testa)	30	30-33
	Movimenti fetali (latero-laterali)	30	30-34

*Figura 26. Tempi di rilevazione ecografica e conseguente di sviluppo di alcune strutture fetali ed extrafetali durante i primi 30 giorni di gravidanza della gatta. Zambelli et al., 2002.*

Stomaco	Dorsale al fegato	30	30-32
	Caudale al fegato	49	48-50
	Pieghe gastriche	54	54-57
Intestino	Compare	40	38-42
	Struttura stratificata	54	52-56
Occhi	Compaiono	35	35-39
	Lenti del cristallino	50	47-50
Scheletro	Vertebre	40	35-40
	Ossificazione: diafisi delle ossa lunghe	50	48-50
Movimenti fetali	Flessione dorso-ventrale	33	32-35
	Arti,collo,testa	37	37-40
	Bocca e lingua	50	48-52
Reni	Isoecogeni col fegato	39	38-41
	Corticale e midollare	50	48-50
Apparato cardio-vascolare	Camere cardiache	50	48-50
	Vasi maggiori	42	40-44
Diaframma		50	50-56
Cuscinetti podali		35	33-35
Plesso coroideo		40	38-42

Nella pratica, tuttavia, sono utilizzati solo alcuni parametri ecografici per la stima dell'età gestazionale e sono definiti misure fetometriche. Queste misurazioni consistono nelle dimensioni della vescicola embrionale (ICC e ECC), nella distanza cranio-coccige (CRL), nel diametro biparietale del cranio (BP), nel diametro addominale (AD), nel diametro gastrico (GD) e nel diametro interno della vescicola diencefalo-telencefalica (DPTV).

ICC è il diametro interno della vescicola embrionale e si calcola facendo la media tra il diametro ventro-dorsale e quello medio-laterale interno della vescicola (Son et al., 2001; Beccaglia e Luvoni, 2006).

ECC è il diametro esterno della vescicola embrionale e si calcola come il precedente facendo la media tra il diametro ventro-dorsale e quello medio-laterale, questa volta esterno, della vescicola (Beccaglia e Luvoni, 2006).

CRL si calcola misurando la distanza tra il punto più craniale del cranio e l'estremità caudale perineale. (Son et al., 2001; Zambelli et al., 2002; Beccaglia e Luvoni, 2006).

BP si calcola misurando la distanza tra le due ossa parietali del cranio, che devono essere parallele tra loro in sezione frontale (Son et al., 2001; Zambelli et al., 2002; Beccaglia e Luvoni, 2006).

AD si calcola a livello di fegato e stomaco, facendo la media tra il diametro ventro-dorsale e quello medio-laterale (Nyland e Mattoon, 1995; Son et al., 2001; Zambelli et al., 2002; Beccaglia e Luvoni, 2006).

GD si calcola a livello del punto più largo dello stomaco, facendo la media tra il diametro ventro-dorsale e quello medio-laterale (Zambelli et al., 2002).

DPTV si calcola misurando il diametro della porzione che rappresenta il talamo ed i nuclei basali primordiali in sezione frontale quando le ossa parietali sono parallele. (Beccaglia e Luvoni, 2008; Beccaglia et al., 2008).

L'età gestazionale può essere calcolata tramite l'utilizzo di equazioni a partire da questi parametri. In particolare, nella prima metà della gravidanza si ha che:

$$\text{GA} = (\text{CRL} + 31,43) / 2,0087$$

$$\text{GA} = (\text{ECC} + 12,13) / 1,602$$

$$\text{GA} = (\text{ICC} + 11,566) / 1,368$$

Dove i parametri fetometrici sono espressi in millimetri.

Nella seconda metà della gravidanza si ha invece che:

$$\text{GA} = [\log(y/a)]/b$$

**GA = età gestazionale**

**y = diametro osservato in cm: AD (diametro addominale), GD (diametro gastrico) o BP (diametro biparietale)**

**Per AD: a = 0,405565; b = 0,0372141**

**Per GD: a = 0,115113; b = 0,0388901**

**Per BP: a = 0,483873; b = 0,02756**

Altre formule si possono utilizzare per determinare i giorni dal parto:

$$\text{DBP} = (\text{BP} - 23,39) / 0,47$$

$$\text{DBP} = (\text{DPTV} - 10,74) / 0,22$$

**DBP = giorni dal parto**

**BP = diametro biparietale**

**DPTV = diametro vescicola diencefalo-telencefalica.**

(Zambelli et al., 2004)

In alternativa ci si può basare sulla corrispondenza tra età gestazionale e misure fetometriche riportate da vari autori, sebbene con leggere differenze tra loro.

Per esempio, secondo Knospe et al., 2002 e Zambelli et al., 2006, diametri della vescicola embrionale di 19-22 mm corrispondono circa al 20° giorno di gestazione, vescicole attorno ai 27-30 mm corrispondono a circa il 25° giorno di gestazione e vescicole di 34-37 mm corrispondono circa al 30° giorno di gestazione. Successivamente al primo mese risulta difficile la misurazione del diametro delle vescicole, per cui si può utilizzare invece il diametro addominale, che sempre secondo Zambelli et al., 2006, trova corrispondenza tra gli 1,8 cm e il 45° giorno di gestazione e i 3,8 cm e il 60° giorno di gestazione. Per il periodo intermedio, ovvero intorno al 40° giorno di gestazione la stadiazione della gravidanza può essere fatta tramite i rilievi ecografici del tratto intestinale o della divisione vertebrale.

## 2. MATERIALI E METODI

Lo studio si basa sull'analisi dei liquidi fetali di 18 gatte randagie gravide, provenienti dal programma di controllo della popolazione felina della regione Emilia-Romagna, a uno stadio di gestazione compreso tra i 20 e i 60 giorni e giudicate sane alla visita clinica.

All'esame ecografico la misurazione del diametro delle vescicole embrionali ha permesso di confermare l'età gestazionale delle gatte nelle fasi più precoci della gravidanza, mentre oltre i 30 giorni, essendo le dimensioni della vescicola difficili da misurare tramite ecografia, è stato adottato un metodo diverso, in particolare è stata sfruttata la corrispondenza tra il diametro addominale del feto e il momento della gestazione in cui viene effettuata la misurazione.

In base all'età gestazionale stimata le gatte sono state poi suddivise in sei gruppi: **D20** dal 15° al 21° giorno di gravidanza, **D25** dal 22° al 28° giorno di gravidanza, **D30** dal 29° al 35° giorno di gravidanza, **D40** dal 36° al 42° giorno di gravidanza, **D45** dal 43° al 49° giorno di gravidanza, **D60** dal 57° al 63° giorno di gravidanza.

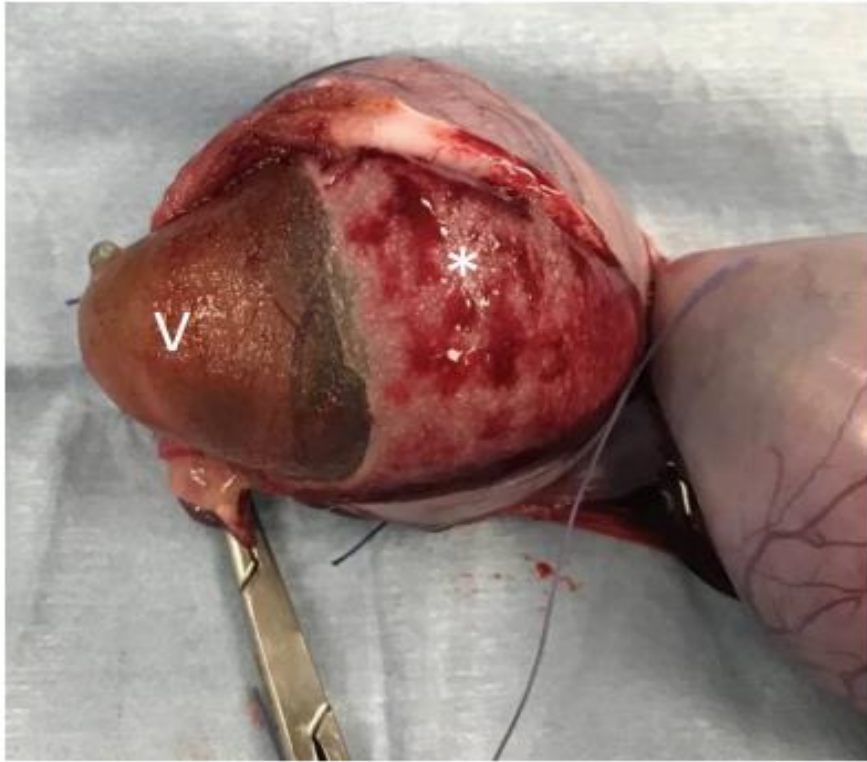
Per la procedura chirurgica atta al prelievo di liquidi fetali si è proceduto con una premedicazione per via intramuscolare con ketamina (5 mg/kg; *Lobotor*<sup>®</sup>), dexmedetomidina (7 mcg/kg; *Dexdomitor*<sup>®</sup>) e butorfanolo (0,2 mg/kg; *Nargesic*<sup>®</sup>); successivamente sono stati somministrati propofol (3 mg/kg; *Proposure*<sup>®</sup>) per via intravenosa e una terapia antimicrobica a scopo profilattico composta da una combinazione di benzylpenicillina e streptomina (2 ml/10 kg; *Neotardocillina*<sup>®</sup>) per via intramuscolare e una terapia antinfiammatoria con robenacoxib (2 mg/kg; *Onsior*<sup>®</sup>) per via sottocutanea. Le gatte sono state poi intubate, previa applicazione di

lidocaina sulle cartilagini aritenoidi. L'anestesia è stata mantenuta tramite utilizzo di isoflurano (1,5-2%) in ossigeno. È stata quindi eseguita una ovarioisterectomia in laparotomia, con accesso dalla linea ventrale. Nel giro di 10-15 minuti dalla rimozione di utero e ovaie si è poi proseguito con un delicato distaccamento delle vescicole embrionali dall'utero (Fig. 28-29), la misurazione delle vescicole embrionali e il prelievo dei liquidi allantoideo (ALL, fig. 30) e amniotico (AMN, fig. 31). Il prelievo è stato eseguito con un ago 23G connesso con una siringa da 2,5 ml e i fluidi prelevati sono stati immediatamente congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

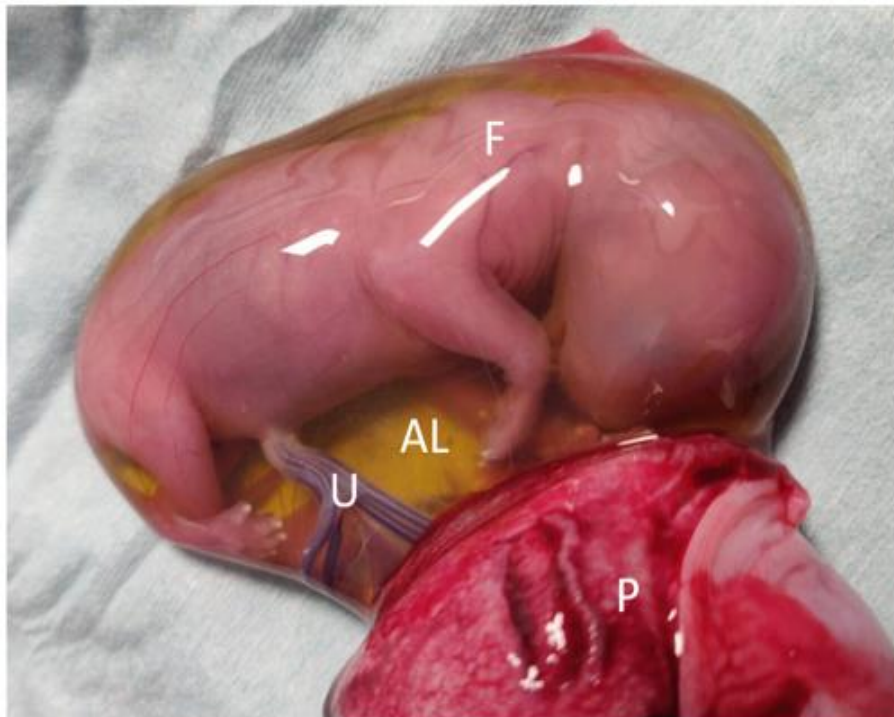
*Figura 27. utero post ovarioisterectomia contenente tre vescicole embrionali. Bigliardi et al., 2022.*



*Figura 28. Dissezione di una vescicola embrionale dall'utero.  
V: vescicola embrionale; \*: membrana corionica. Bigliardi et al., 2022.*

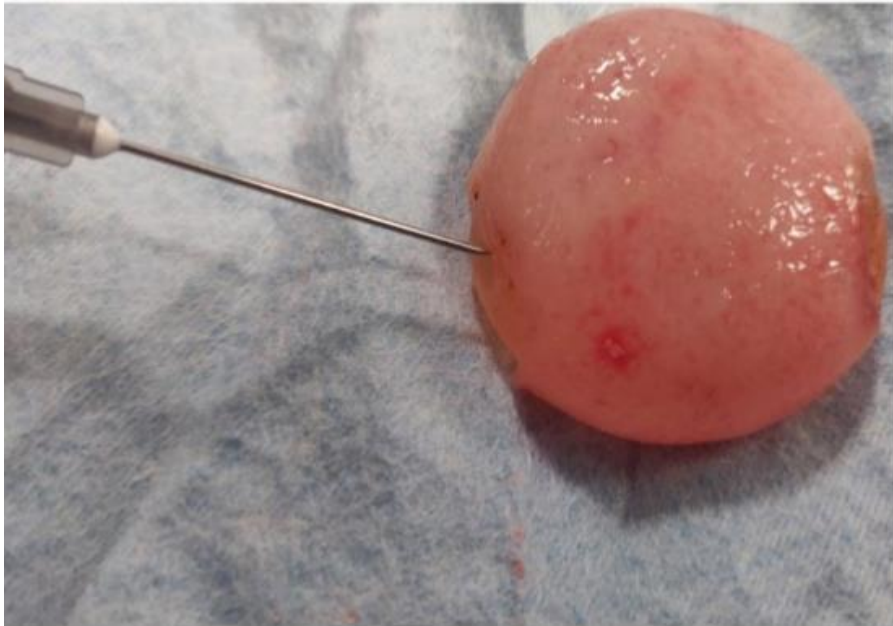


*Figura 29. Escissione di una vescicola embrionale, in cui sono ben visibili il feto (F), il cordone ombelicale (U), la placenta (P) e il sacco allantoideo (AL) contenente fluido giallastro.  
Bigliardi et al., 2022.*





*Figura 30. prelievo di liquido allantoideo da una vescicola embrionale di circa 20 giorni.  
Bigliardi et al., 2022.*



*Figura 31. Prelievo di liquido amniotico dalla stessa vescicola embrionale della figura 30.  
Bigliardi et al., 2022.*



Nel gruppo D20 sono stati prelevati 7 campioni di AMN e 0 di ALL, sia in D25 che in D30 e D40 sono stati prelevati 7 campioni di AMN e 7 di ALL e infine in entrambi D45 e D60 sono stati prelevati 8 campioni di AMN e 8 campioni di ALL.

Successivamente sui campioni prelevati sono state svolte analisi biochimiche, tramite l'utilizzo di una Cobas Integra<sup>®</sup> 400 Plus (Roche Diagnostics International AG; Risch-Rotkreuz, Switzerland) e una Cobas C pack reagents (Roche Diagnostics S.p.A.; Monza (MB), Italy).

In particolare, sono state analizzate le seguenti molecole:

- albumina (ALB)
- fosfatasi alcalina (ALP)
- amilasi (AMY)
- bilirubina (BIL)
- colesterolo (CHOL)
- creatinina (CREA)
- creatina chinasi (CK)
- gamma-glutamil transferasi (GGT)
- globuline (GLO)
- glucosio (GLU)
- aspartato aminotransferasi (AST)
- alanina aminotransferasi (ALT)
- lattato deidrogenasi (LDH)
- lipasi (LIPA)
- proteine totali (PT)
- trigliceridi (TRIG)
- urea (UREA)
- peso specifico (SG)

### 3. RISULTATI

I risultati delle analisi biochimiche, che saranno trattati successivamente in maniera dettagliata, sono stati paragonati tra i diversi gruppi di età gestazionale, i diversi liquidi fetali e il siero materno (Fig.32). sono stati inoltre paragonati i valori ottenuti con analisi simili svolte su cagne a termine in uno studio di Veronesi et al., 2018.

*Figura 32. Concentrazione dei componenti biochimici in ALL e AMN in gruppi di gatte con età gestazionale progressiva, comparati con analisi biochimiche simili in cagne a termine, dati ripresi da uno studio di Veronesi et al.,2018 e Bigliardi et al., 2022.*

	D20	D25	D30	D40	D45	D60	DOG
<b>ALBUMIN (G/L)</b>							
AMN	0.3 ± 0.1	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.05	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.05	0.49 ± 0.1	0.8 ± 0.05
ALL		0.1 ± 0.06	0.08 ± 0.07	0.1 ± 0.02	0.55 ± 0.15	0.86 ± 0.05	0.9 ± 0.05
<b>ALP (U/L)</b>							
AMN	15.8 ± 2.8	2.4 ± 0.5	121.7 ± 27.6	507.1 ± 9.6	437.2 ± 66.5	74 ± 7.9	126.0 ± 6.76
ALL		5.8 ± 2	3.9 ± 1.9	2.7 ± 0.6	234.1 ± 30.8	46.9 ± 6.5	25.7 ± 3.29
<b>AMY (U/L)</b>							
AMN	2.5 ± 0.1	2.88 ± 0.19	13.75 ± 6.3	13.3 ± 6.3	25.47 ± 5.5	64.3 ± 9.3	40.0 ± 3.01
ALL		7.2 ± 1.6	8.7 ± 7.3	8.4 ± 5.5	37.5 ± 9.7	172 ± 10.6	33.2 ± 1.9
<b>BIL (MG/DL)</b>							
AMN	0.08 ± 0.007	0.07 ± 0.005	0.21 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.38 ± 0.6	0.2 ± 0.02
ALL		0.02 ± 0.005	0.08 ± 0.04	0.09 ± 0.05	0.14 ± 0.02	0.86 ± 0.04	0.6 ± 0.05
<b>CHOL (MG/DL)</b>							
AMN	0.67 ± 0.5	2.11 ± 1.01	2.33 ± 3.21	1.33 ± 1.53	1.47 ± 0.5	3.34 ± 0.58	3.3 ± 0.41
ALL		2.2 ± 0.8	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.5	5.2 ± 1	2.6 ± 0.5	3.7 ± 0.56
<b>CREA (MG/DL)</b>							
AMN	0.58 ± 0.01	0.84 ± 0.01	0.74 ± 0.23	0.68 ± 0.04	0.51 ± 0.04	13.93 ± 6.12	2.8 ± 0.15
ALL		0.65 ± 0.01	0.98 ± 0.4	2.8 ± 1.6	0.6 ± 0.07	11.2 ± 3.4	28.3 ± 2.33
<b>CK (U/L)</b>							
AMN	36.5 ± 2.2	5.3 ± 1.5	2.4 ± 1.1	2.7 ± 0.6	1 ± 0	5.7 ± 1.6	3.2 ± 0.41
ALL		13.5 ± 6	23.25 ± 25.6	7.7 ± 7.2	2.9 ± 1.6	35.4 ± 11.3	10.3 ± 1.72
<b>GGT (U/L)</b>							
AMN	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.04	34.25 ± 1.89	58.4 ± 10.72	111.3 ± 13.05	26.8 ± 4.67	3.7 ± 0.24
ALL		0.1 ± 0.05	1.1 ± 0.25	1.99 ± 1	71.4 ± 7	36.5 ± 2.2	59.8 ± 8
<b>GLO (G/L)</b>							
AMN	0.1 ± 0	0.1 ± 0	0.11 ± 0.01	0.1 ± 0	0.09 ± 0.02	1.08 ± 0.8	1.0 ± 0.19
ALL		0 ± 0	0.07 ± 0.05	0.4 ± 0.5	0.47 ± 0.1	2.7 ± 0.1	5.3 ± 0.46
<b>GLU (MG/DL)</b>							
AMN	84.5 ± 1.3	58 ± 2	73.3 ± 19.8	68.5 ± 1.38	47 ± 3	62.7 ± 3.5	24.5 ± 1.38
ALL		107.2 ± 4.5	89.1 ± 28.4	71 ± 13.7	51.6 ± 2.1	73.7 ± 4	26.6 ± 2.22
<b>AST (U/L)</b>							
AMN	7.3 ± 1.5	3.2 ± 0.7	1.7 ± 0.7	3 ± 3	4 ± 1	14.3 ± 1.6	9.4 ± 0.58
ALL		4 ± 1	3.4 ± 1.2	5 ± 2.6	3.4 ± 0.5	22.2 ± 0.7	11.4 ± 1.16
<b>ALT (U/L)</b>							
AMN	2.5 ± 1.3	1 ± 0	1.8 ± 0.7	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1.10 ± 0.11
ALL		0.9 ± 0.3	2.7 ± 2	4 ± 2.6	1.1 ± 0.1	1.4 ± 0.5	2.5 ± 0.8
<b>LDH (U/L)</b>							
AMN	382.5 ± 6.2	113.4 ± 10.2	21.5 ± 12.2	81.4 ± 50.7	12.2 ± 1.7	283 ± 18.7	29.8 ± 2.8
ALL		63.2 ± 5.5	82.6 ± 7.2	53.9 ± 5.5	26.9 ± 3.5	510 ± 23.1	116.6 ± 16.62
<b>LIPA (U/L)</b>							
AMN	2.6 ± 1.5	3.1 ± 1.6	8.5 ± 1.5	8.7 ± 1.5	22 ± 2	9.9 ± 1	5.8 ± 0.25
ALL		1.8 ± 1	3.2 ± 1	5 ± 1	17.7 ± 2.5	20.1 ± 1	11.6 ± 0.99
<b>PT (G/L)</b>							
AMN	0.4 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.25 ± 0.05	0.26 ± 0.05	0.2 ± 0.05	1.9 ± 0.3	1.5 ± 0.18
ALL		0.1 ± 0.05	0.2 ± 0.07	0.2 ± 0.02	1.2 ± 0.4	3.4 ± 0.2	5.2 ± 0.51
<b>TRIG (MG/DL)</b>							
AMN	7.4 ± 0.1	3 ± 1	5.25 ± 2.6	5.7 ± 2.1	2.6 ± 0.5	17.6 ± 3.4	13.7 ± 2.31
ALL		1.5 ± 0.5	2.2 ± 0.3	2 ± 0	3.5 ± 1.5	6.6 ± 0.5	17.5 ± 3.28
<b>UREA (MG/DL)</b>							
AMN	62.7 ± 3	53.9 ± 0.4	64.7 ± 15.4	60.1 ± 1.8	45.8 ± 0.9	64.9 ± 0.25	40.7 ± 2.03
ALL		41.8 ± 3.3	62.1 ± 13.8	64.1 ± 6.1	44.5 ± 1.9	63.7 ± 4	74.6 ± 7.43
<b>SG</b>							
AMN	1008 ± 0	1007.1 ± 0.210	1006.75 ± 1.3	1006.1 ± 1.9	1006.5 ± 0.5	1010.4 ± 2.6	
ALL		09.5 ± 0.5	1006.7 ± 1.1	1006.9 ± 1.54	1006.6 ± 0.5	1020.5 ± 1.2	

### **3.1 Enzimi epatici**

#### ALT

Per quanto riguarda l'alanina aminotransferasi, si è notato come le concentrazioni della molecola fossero minori sia in AMN che in ALL rispetto al siero materno SM, mentre non sono state riscontrate differenze significative nei vari periodi gestazionali.

#### ALB

Come per le ALT, anche nelle albumine la concentrazione nei liquidi fetali è risultata essere minore rispetto alla concentrazione sierica materna, mentre è stato constatato un progressivo aumento lungo il periodo gestazionale. Nelle fasi finali della gestazione, in particolare in D60, si è poi visto come le concentrazioni di albumina fossero maggiori in ALL rispetto che in AMN ( $p < 0.05$ ).

#### AST

Anche per l'aspartato aminotransferasi la concentrazione nei liquidi fetali è risultata minore rispetto alla concentrazione sierica materna, tuttavia si è notato come successivamente al periodo gestazionale corrispondente al gruppo D45, i valori si avvicinassero sempre di più a quelli sierici a inizio gravidanza, in particolare per ALL.

#### LDH

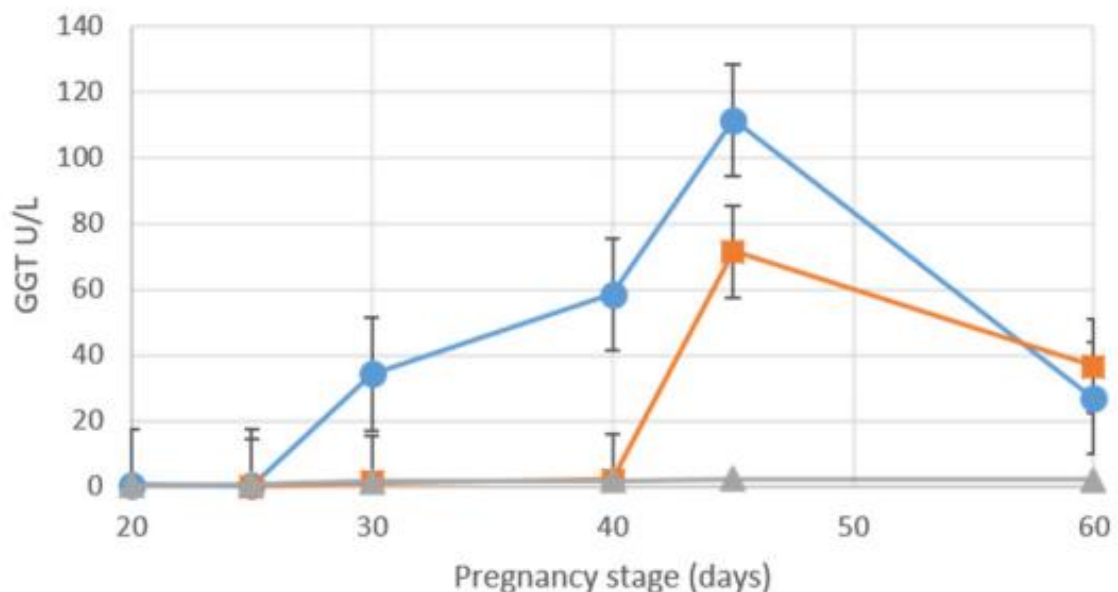
Le concentrazioni di lattato deidrogenasi sono variate solamente nei liquidi fetali, restando invece abbastanza costanti nel siero materno. In AMN si è raggiunto il picco a D20, seguito poi da una diminuzione fino a D45 e

successivamente un nuovo incremento. In ALL, invece, si è visto un incremento fino a D45, seguito da una riduzione fino a D45, per poi raggiungere valori massimi a D60.

## GGT

Per quanto riguarda le concentrazioni di gamma-glutamyl transferasi, si è visto come queste avessero andamenti diversi in ALL e AMN. In particolare, in ALL sono risultate essere simili alle concentrazioni sieriche materne fino all'età gestazionale corrispondente a D40, per poi aumentare successivamente. In AMN invece sono risultate essere simili alle concentrazioni sieriche solo fino a D25, successivamente al quale sono aumentate progressivamente fino a D45, per poi invece decrescere, così come in ALL, fino a D60 (Fig. 33). Per questo motivo è riscontrabile una differenza più significativa nelle concentrazioni di gamma-glutamyl transferasi in ALL e AMN in D30 e D40 ( $p < 0.05$ ).

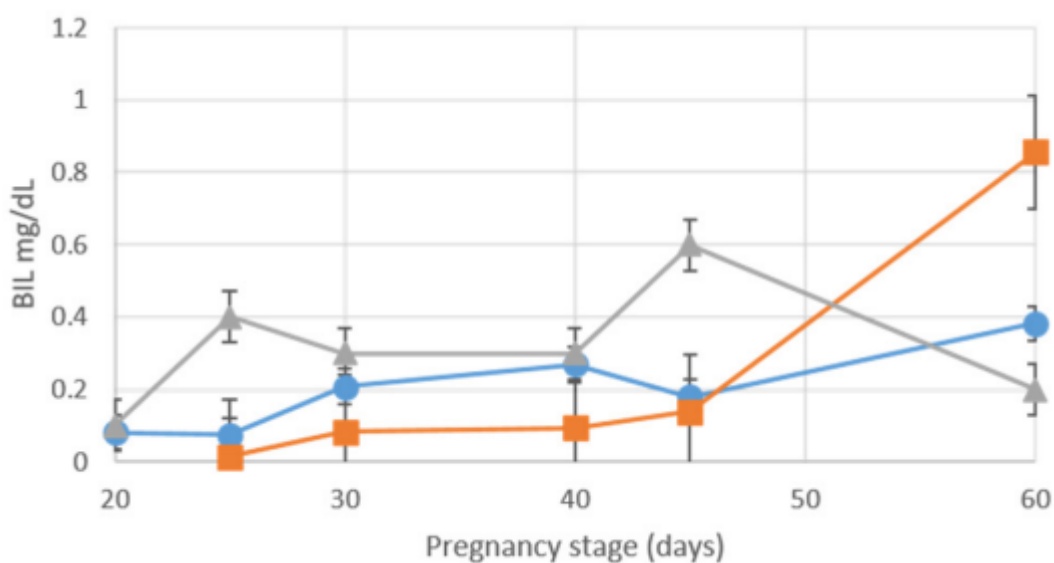
*Figura 33. Concentrazione di GGT in siero materno (triangolo), liquido amniotico (cerchio) e liquido allantoideo (quadrato). Bigliardi et al., 2022.*



## BIL

Durante il periodo gestazionale si è vista cambiare, oltre alla concentrazione nei liquidi fetali, anche la concentrazione sierica materna di bilirubina, che è andata aumentando tra D20 e D25 e tra D40 e D45, per poi diminuire tra D45 e D60 (Fig. 34). Nei liquidi fetali, lungo la gestazione si è notato un incremento della concentrazione di bilirubina, più marcato in ALL rispetto ad AMN, con il raggiungimento dei valori massimi per entrambi a D60.

*Figura 34. Concentrazione di BIL in siero materno (triangolo), liquido amniotico (cerchio) e liquido allantoideo (quadrato). Bigliardi et al., 2022.*

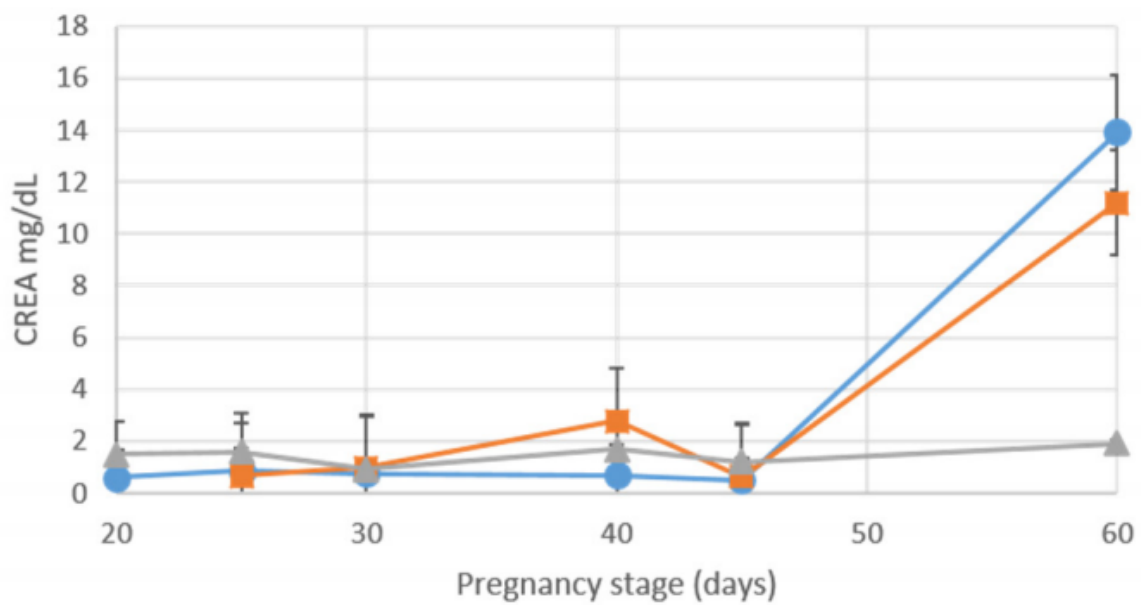


## 3.2 Enzimi renali

### CREA

La concentrazione di creatinina in AMN è cresciuta da D45 in poi, mentre in ALL ha subito una crescita minore da D30 a D40, per poi aumentare maggiormente da D45 in poi (Fig. 35). Ad esclusione del periodo finale, in genere le concentrazioni di creatinina nei liquidi fetali sono risultate simili a quelle del siero materno.

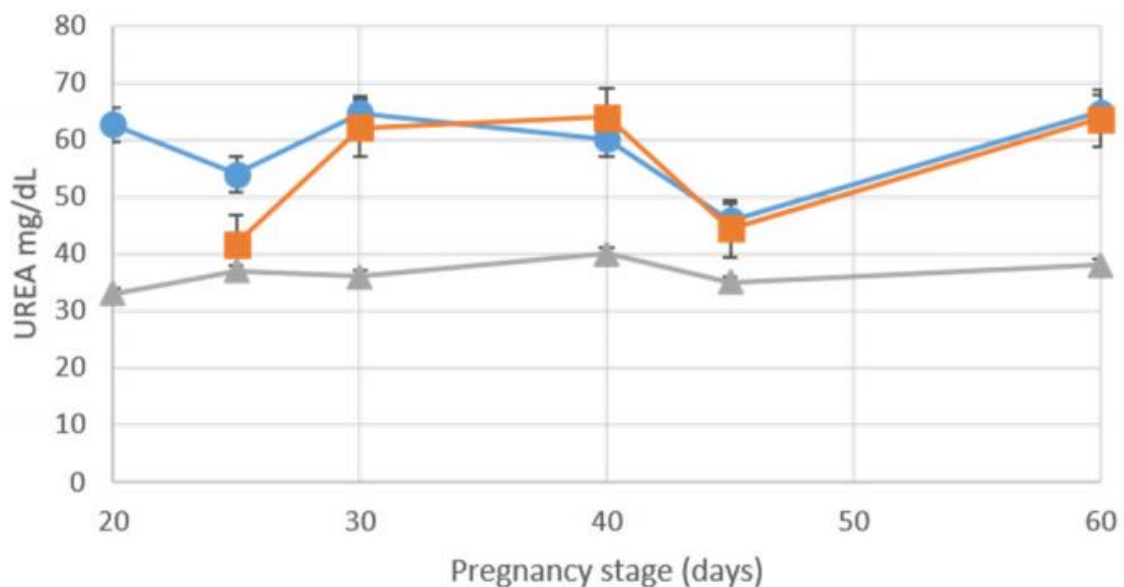
*Figura 35. Concentrazione di CREA in siero materno (triangolo), liquido amniotico (cerchio) e liquido allantoideo (quadrato). Bigliardi et al., 2022.*



## UREA

Per quanto riguarda l'urea si è visto come la sua concentrazione a livello sierico materno rimanesse costante durante l'intera gravidanza, mentre le concentrazioni nei liquidi fetali, pur restando superiori alla concentrazione sierica, variassero nei vari gruppi. In particolare, in AMN la concentrazione di urea è diminuita fino a D25, per poi aumentare fino a D30 e diminuire nuovamente fino a D45, mentre in ALL la concentrazione è in aumento da D25 a D40, successivamente diminuita fino a D45, per poi seguire un ultimo incremento, così come in AMN, fino a D60 (Fig. 36).

*Figura 36. Concentrazione di UREA in siero materno (triangolo), liquido amniotico (cerchio) e liquido allantoideo (quadrato). Bigliardi et al., 2022.*





### **3.3 Enzimi pancreatici**

#### AMY

Le concentrazioni sieriche materne di amilasi sono risultate maggiori rispetto a quelle dei liquidi fetali per tutta la durata della gestazione. Nel dettaglio, in ALL sono andate aumentando successivamente a D45.

#### LIPA

Così come per le AMY, le concentrazioni sieriche materne di lipasi sono risultate maggiori rispetto a quelle dei liquidi fetali per tutta la durata della gestazione, inoltre sono risultati simili anche gli andamenti delle concentrazioni delle due molecole in ALL. Si è notato invece un andamento diverso nelle concentrazioni di lipasi rispetto a quelle di amilasi in AMN: si è riscontrato un incremento progressivo fino a D45, momento in cui è stato raggiunto il picco massimo, seguito poi da una decrescita fino a D60. È da sottolineare come tra D45 e D60 i valori raggiunti in AMN fossero paragonabili a quelle in MS.

### **3.4 Enzimi muscolari**

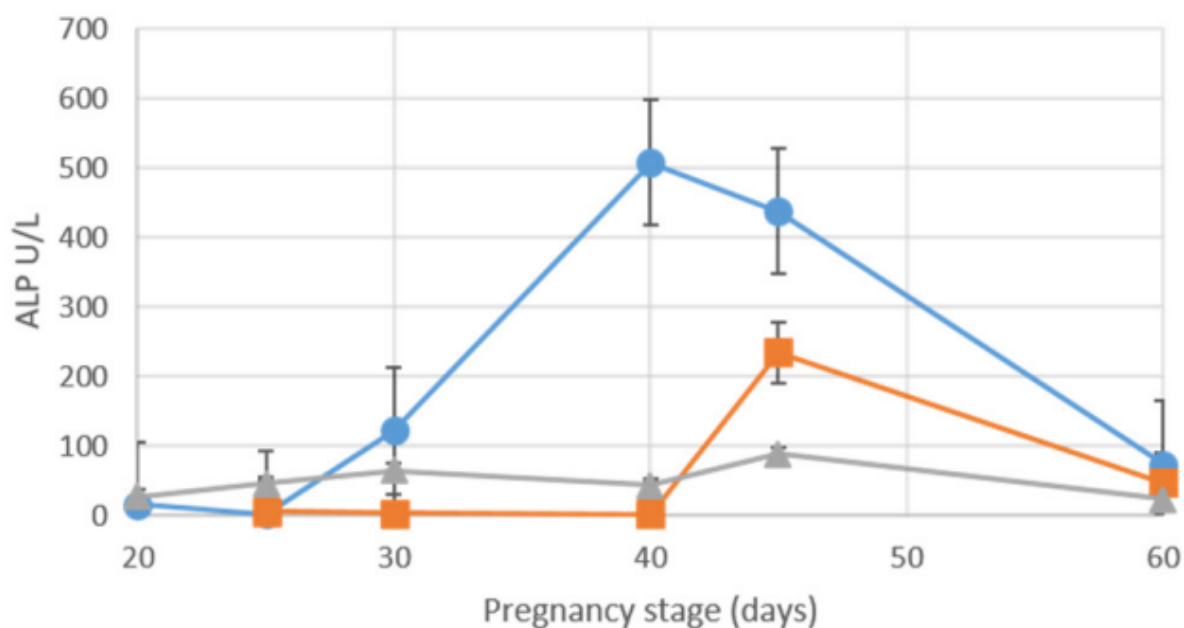
#### CK

Le concentrazioni di creatina chinasi in ALL e AMN sono risultate minori rispetto a quelle del siero materno, rimasto costante, per tutta la durata della gravidanza.

## ALP

Le concentrazioni di fosfatasi alcalina hanno subito un incremento in AMN fino a D40, per poi subire una decrescita, particolarmente marcata dopo D45. In ALL invece si è notato un incremento tra D40 e D45, seguito da una diminuzione fino a D60 (Fig. 37). Paragonando i risultati ottenuti in D30 e D40, si è notato come i valori in AMN fossero sempre superiori a quelli in ALL in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

*Figura 37. Concentrazione di ALP in siero materno (triangolo), liquido amniotico (cerchio) e liquido allantoideo (quadrato). Bigliardi et al., 2022.*



### **3.5 Enzimi del metabolismo lipidico**

#### TRIG

La concentrazione di trigliceridi in AMN e ALL è risultata essere sempre minore rispetto al siero materno; tuttavia, si è notato come in AMN aumentassero oltre D45.

#### CHOL

La concentrazione di colesterolo nei liquidi fetali, così come per TRIG, è risultata essere sempre minore rispetto al siero materno, con valori costanti in tutta la gestazione.

### **3.6 Proteine totali, globuline e glucosio**

#### PT

La concentrazione di proteine totali è risultata essere minore sia in ALL che in AMN rispetto alla concentrazione sierica materna, con incrementi in entrambi i liquidi fetali successivamente a D45.

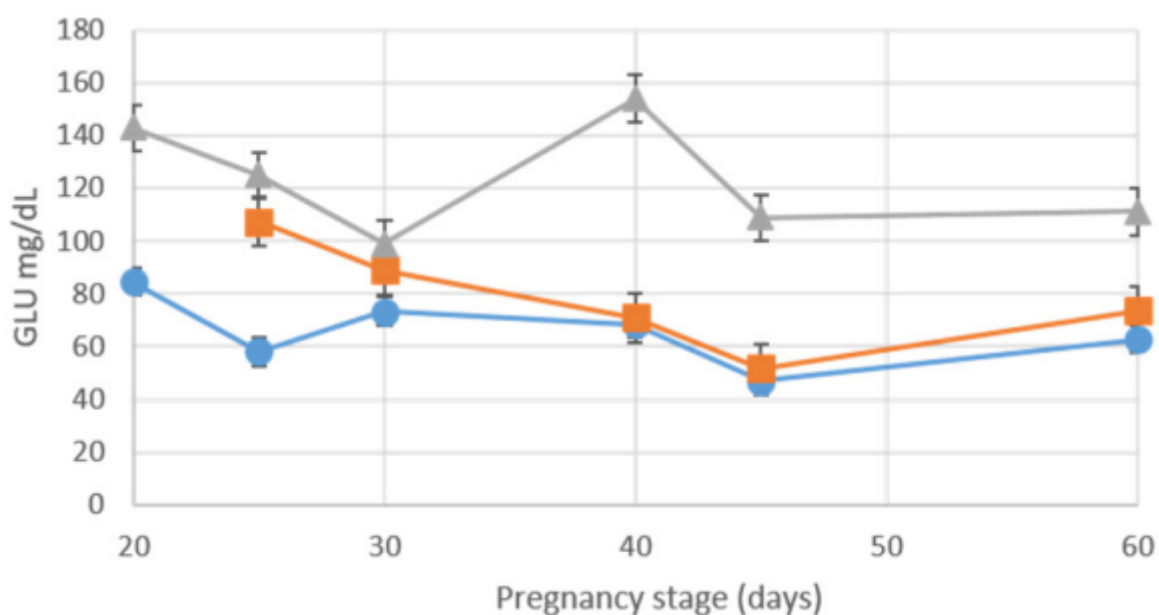
#### GLO

La concentrazione di globuline nei liquidi fetali è risultata essere sempre minore a quella sierica materna, con concentrazioni costanti lungo tutto il periodo gestazionale, ad eccezione della fase finale, corrispondente a D60, a partire dalla quale si è notato un incremento.

## GLU

La concentrazione di glucosio è risultata essere molto simile tra i liquidi fetali e il siero materno, con variazioni che seguivano un simile andamento: si è potuta notare una diminuzione fino a D45, seguita da un lieve incremento fino a D60 (Fig. 38). Analizzando in particolare il periodo tra D25 e D40 si è notato come le concentrazioni di glucosio in AMN fossero minori rispetto a quelle in ALL in maniera statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

*Figura 38. Concentrazione di GLU in siero materno (triangolo), liquido amniotico (cerchio) e liquido allantoideo (quadrato). Bigliardi et al., 2022.*



### **3.7 Peso specifico**

Il peso specifico dei liquidi fetali è risultato essere relativamente costante fino a D45, punto oltre il quale si è assistito ad un aumento delle concentrazioni fino alla fine della gestazione. In generale si è notato come i valori delle concentrazioni del peso specifico in ALL fossero sempre maggiori a quelle in AMN.

## 4. DISCUSSIONE

I risultati ottenuti tramite le indagini biochimiche dei liquidi fetali prelevati, oltre a quelle effettuate sul corrispondente siero materno, hanno potuto mettere in luce come la composizione dei liquidi fetali non sia solamente il risultato della semplice filtrazione del siero materno, ma sia piuttosto la conseguenza di processi più complessi, grazie anche all'importante ruolo che svolge il feto durante tutta la durata della gestazione. Si è potuto concludere anche che, seppur con leggere variazioni, riportate precedentemente, il contenuto dei due liquidi fetali, amniotico e allantoideo, sia molto simile. Si pensa che questa grande somiglianza nella loro composizione sia legata al fatto che, nonostante il sacco amniotico sia vascolarizzato in maniera nettamente minore per tutta la durata della gravidanza, questo risenta del fatto che i suoi vasi decorrano parallelamente alla membrana allantoidea, rendendo possibile il passaggio di sostanze dai vasi allantoidei alle cellule della membrana amniotica (L.Fresno, J.E. Rodriguez et al, 2012). Questo differisce con le indagini svolte invece da Veronesi et al. sui liquidi fetali nella specie canina, secondo le quali le composizioni di liquido amniotico e allantoideo sono diverse, suggerendo che vi siano diversi fattori che influenzino la composizione di ognuno.

Alcuni di questi fattori, da valutare anche nella gatta, sono dati dal fatto che nel liquido allantoideo si accumulino secrezioni renali ad inizio gravidanza e urina nella parte finale della gestazione; nel liquido amniotico è possibile invece ritrovare secrezioni respiratorie, gastroenteriche e cutanee, queste ultime prima che il processo di cheratinizzazione sia concluso.

Altre considerazioni si possono fare riguardo al paragone con ulteriori specie: in particolare altri studi sono stati svolti sulla specie ovina, bufalina e umana.

Nella pecora, in uno studio svolto da Morris, Barron et al., è stato possibile riscontrare come ci fossero variazioni significative tra le componenti dei due liquidi fetali, con variazioni lungo il corso della gravidanza maggiori in ALL, a differenza di AMN in cui i valori sono rimasti costanti lungo l'intero periodo di gestazione. Si ritiene tuttavia che questo sia vero per le proteine prese in esame dallo studio citato, ma non sia probabilmente applicabile alle altre componenti non indagate.

Nella bufala è stata svolta un'analisi proteomica sui liquidi fetali da parte di Ferreira, Codognoto et al., in cui è stato possibile verificare come in questi liquidi siano presenti proteine in grado di distinguere una gravidanza normale da una alterata e di effettuare inoltre diagnosi precoce di gravidanza e stadiazione di quest'ultima. L'utilizzo dell'analisi proteomica per effettuare stadiazione di gravidanza potrebbe essere utilizzato anche nella specie felina, in quanto si è visto come anche in questa specie ci siano variazioni nella concentrazione molecolare nelle varie fasi gestazionali.

È possibile svolgere un paragone anche con le ampie conoscenze riguardanti la specie umana, in cui si è visto come per gran parte degli elementi contenuti nei liquidi fetali, in particolare proteine totali, albumine, trigliceridi, glucosio e colesterolo, la loro concentrazione nei liquidi fetali sia nettamente inferiore alle concentrazioni sieriche materne. In questa specie le variazioni nella composizione dei liquidi fetali nelle diverse fasi di gestazione sono state spiegate con la presenza di cambiamenti concomitanti nell'attività metabolica e di trasporto.

In riferimento ai singoli parametri si può dire che il fatto che l'UREA si accumuli in modo simile lungo i vari periodi gestazionali in entrambi i liquidi fetali, possa essere indicativo della presenza di meccanismi di equilibrio tra i vari compartimenti fetali (Fresno et al., 2012).

La CREA si è vista invece accumularsi in ALL solamente verso la fine della gestazione, probabilmente dovuto al fatto che la creatinina escreta dal feto non passi facilmente nel sangue materno, ma si accumuli quindi progressivamente nei liquidi fetali, in particolare è possibile che si accumuli in ALL in quanto l'urina fetale nel gatto si accumula nella cavità dell'allantocorion (Pelagalli, 2014).

Per entrambe urea e creatinina si è visto come le loro concentrazioni fossero diverse in cane e gatto, accomunate però dal fatto che in entrambe le specie siano maggiori in ALL rispetto ad AMN.

L'aumento delle ALP successivamente a D25 in AMN e a D40 in AMN si ritiene possa essere legato all'ossificazione fetale che avviene in questi periodi. Inoltre, in tutti gli animali giovani ALP presenta una maggiore attività rispetto agli adulti, raggiungendo valori fino a 10 volte maggiori (Hoffman et al., 2008).

Nella specie felina le concentrazioni di AMY sono minori nei liquidi fetali rispetto al siero materno, a differenza di ciò che avviene invece nella specie umana, dove queste concentrazioni sono minori nei liquidi fetali, ma in maniera nettamente meno drastica (Tong et al., 2009) e nella specie canina in cui le concentrazioni nei fluidi presi in esame sono simili (Veronesi et al., 2018). Questo può indicare un'attività ridotta di amilasi nel pancreas, legato alle scarse funzioni digestive attive nel periodo fetale. Nel periodo finale della gravidanza, tuttavia, si è visto un aumento nei

liquidi fetali di amilasi, così come di lipasi, molto probabilmente legato a una maggiore maturazione renale, che porta quindi a un più efficiente filtraggio delle proteine di piccole dimensioni.

La maggior concentrazione di GGT in AMN rispetto ad ALL nella specie felina è in contrasto con i valori riscontrati in quella canina. L'aumento delle concentrazioni di gamma-glutamyl transferasi nelle varie fasi della gravidanza è invece un punto in comune tra le varie specie domestiche animali e la specie umana, per via del legame tra questo enzima e la crescita fetale, in particolare dovuta al suo ruolo di trasporto di amminoacidi attraverso le membrane cellulari di fegato, pancreas e altri organi.

Un ruolo simile al GGT lo svolge AST, che a sua volta si occupa della sintesi proteica e della produzione di ammoniaca. L'incremento della concentrazione di aspartato aminotransferasi nei liquidi fetali relativi all'ultimo quarto del periodo gestazionale può essere spiegato con la completa formazione renale che avviene intorno a D40.

Per la BIL sono stati riscontrati valori maggiori nelle concentrazioni dei liquidi fetali rispetto a quelle sieriche materne, con valori maggiori a fine gravidanza, dato che coincide con ciò che avviene nella specie canina e in quella umana. È possibile che pur producendo bilirubina attraverso il fegato durante tutta la durata della vita fetale, questa si diffonda in AMN prima della completa maturazione renale, mentre successivamente a D40-D45 si possa accumulare in ALL. Questi dati concordano con quelli di Fresno et al.

Il fatto che le concentrazioni sieriche materne di TRYG e CHOL siano nettamente maggiori rispetto ai liquidi fetali, così come avviene per altri



componenti nutrizionale come le proteine totali e il glucosio, suggerisce che i liquidi fetali non siano componenti importanti per la nutrizione fetale. Questi dati concordano con ciò che è stato riscontrato in studi precedenti sia nella specie umana che in quella canina.

Per quanto riguarda le concentrazioni di glucosio, si è fatta particolare attenzione a variazioni in questo parametro, visto il legame sia nella specie umana che in quella canina tra gravidanza e l'instaurarsi di insulino-resistenza. Ciò che è risultato dagli studi sulla specie felina però ha messo in luce come nel siero materno non siano avvenuti particolari cambiamenti nella concentrazione di glucosio, indicativo del fatto che nella gatta, a differenza delle altre due specie citate vi sia meno influenza da parte del progesterone sulla modulazione delle concentrazioni sanguigne di insulina.

## 5. CONCLUSIONI

Grazie alle analisi biochimiche svolte sui campioni fetali e materni si è potuto concludere che, a differenza di ciò che si riteneva in passato, i liquidi fetali non possono essere più considerati come il semplice risultato della filtrazione del sangue materno, ma devono essere visti piuttosto come fluidi costituiti per la maggior parte da componenti derivanti dalle diverse funzioni fisiologiche del feto, che le modula lungo tutta la durata della gravidanza.

Sono state riconosciute differenze, per alcuni parametri significative, nelle concentrazioni di componenti biochimici nelle diverse fasi della gestazione, oltre che differenze, ma anche punti in comune, con altre specie, compresa quella umana.

Saranno necessari ulteriori studi per approfondire sia la correlazione tra la composizione biochimica dei liquidi fetali e lo sviluppo del feto, legato anche alla maturazione dei vari organi deputati poi all'escrezione di sostanze, sia la possibilità, tramite l'analisi di liquido amniotico e allantoideo, di riscontrare eventuali stati patologici nel corso della gravidanza.

## BIBLIOGRAFIA

Aralla M., Mobasheri A., Groppetti D., Cremonesi F., Arrighi S., *Expression of aquaporin water channels in canine fetal adnexa in respect to the regulation of amniotic fluid production and absorption*, 2012.

Barone R., *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, 2009.

Beaver BV, *Female feline sexual behavior*. In: *Feline behavior: a guide for veterinarians*. WB Saunders, 2003.

Beccaglia, Anastasi, Grimaldi, Rota, Faustini, Luvoni, *Accuracy of prediction of parturition date through ultrasonographic measurement of fetal parameters in the queen*, Vet Res Commun, 2008.

Beccaglia, Faustini, Luvoni, *Ultrasonographic study of deep portion of Diencephalo-Telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus*, Reprod Dom Anim, 2008.

Beccaglia e Luvoni, *The prediction of parturition date in canine pregnancy*, Reprod Dom Anim, 2006.

Bigliardi E., Rizzi M., Bertocchi M., Denti L., Bresciani C., Vetere A., Di Ianni F., *Evaluation of biochemical composition of amniotic and allantoic fluids at different stages of pregnancy in queens*, Animals, 2022.

Christiansen, *La riproduzione nel cane e nel gatto*, ed. italiana a cura di F. Cairoli e G.Bono, edi-ermes, 1987.

Dyce, Sack, Wensing, *Testo di anatomia veterinaria*, 3<sup>rd</sup> ed., ed. italiana a cura di Ceccarella, Germanà, Mascarello, Peirone e Scapolo, Antonio Delfino Editore, 2006.

Duke S., *Fisiologia degli animali domestici*. Edit. Idelson-Gnocchi, 2002.

England GCV, *Pregnancy diagnosis, abnormalities of pregnancy and pregnancy termination*. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. BSAVA, 1998.

England GCW, Von Heimendahl A. *Riproduzione e neonatologia del cane e del gatto*. Edizioni Veterinarie, 2013.

Ferreira Tavares Boy, Codognoto, Faleiros-Lima, Yamada, Rydygier de Ruediger, Paranzini, *Proteomic analysis of amniotic and allantoic fluid from buffaloes during foetal development*, 2019.

Fresno L., Rodriguez-Gil J.E., Rigau T., Pastor J., Rivera del Alamo M.M., *Modulation of the biochemical composition of amniotic and allantoic fluids as a control mechanism of feline foetal development*, 2012.

Gruffydd-Jones TJ, *The reproductive system*. In: *Feline Medicine and Therapeutics*. BSAVA, 2004.

Hoffman, W.E. Solter, P.F. *Diagnostic enzymology of domestic animals*. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed.; Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L., Eds.; Elsevier Inc., 2008.

Knospe C., *Periods and stages of the prenatal development of the domestic cat*. *Anat. Histol. Embryol.*, 2002.

Kustritz, *Reproductive behaviour of small animals*, Theriogenology, 2005.

Lawler DF, Johnston SD, Hegstad RL, Keltner DG, Owens SF. *Ovulation without cervical stimulation in domestic cats*. *J Reprod. Fert*, 1993.

Levy X e England GCV, *Pregnancy diagnosis, normal pregnancy and parturition in the queen*. In: *Manual of Canine and Feline Reproduction and Neonatology*. BSAVA, 2010.

Mastronardi M., Minoa P., *Ostetricia e riproduzione degli animali domestici*, 1980.

McDonald, *Veterinary endocrinology and reproduction*, 4th ed., Lea & Febiger, 1989.

Minazaki C.K., Gagiotti S., Zago D., Terra W., Araujo V.C., Oliveira R.A., Bevilacqua E. *Acid phosphatase and cathepsin D are active expressed enzymes in the placenta of the cat*. Res. Vet. Sci., 2008.

Morris I.G., Barron A., *The protein composition of sheep fetal fluids*, 1979.

Nyland, Mattoon, *Pregnancy diagnosis and fetal development; Fetal measurements and estimation of fetal age*. In: *Veterinary diagnostic ultrasound*, WB Saunders company, 1995.

Pelagalli G.V., Castaldo L., Lucini C., Patruno M., Scocco P., *Embriologia-Morfogenesi e Anomalie Dello Sviluppo*, 3rd ed., Idelson-Gnocchi, 2014.

Pieri NCG., Souza AF., Casals JB., Roballo KCS., Ambrosio CE., Martins DS., *Comparative Development of Embryonic Age by Organogenesis in Domestic Dogs and Cats*, 2015.

Root MV., Johnston SD., Olson PN. *Estrus length, pregnancy rate, gestation and parturition lengths, litter size, and juvenile mortality in the domestic cat*. J Am Anim Hosp Assoc, 1995.

Root Kustritz MV., *Diagnostico de preñez y cuidados de la perra o gata preñada*. In: *Reproduccion en caninos y felinos domesticos*. Inter-medica editorial, 2006.

Schindler M., Pendzialek SM., Grybel K., Seeling T., Navarrete Santos A., *Metabolic profiling in blastocoel fluid and blood plasma of diabetic rabbits*, 2020.

Son, Jeong, Kim, Park, Kim e Lee, *Establishment of the prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs*, J.Vet.Med.Sci., 2001.

Tong, X.L., Wang, L., Gao, Y.G., Qin, Y.G., Xu, Y.P. *Potential function of amniotic fluid in foetal development - Novel Insight by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late pregnancy*. J. Chin. Med. Assoc., 2009.

Tsutsui, Nakagawa, Hirano, Nagakubo, Shinomiya, Yamamoto e Hori, *Breeding season in female cats acclimated under a natural photoperiod and interval until puberty*, J. Vet. Med. Sci., 2004.

Tsutsui T, Stabenfeldt GH. *Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat*. J. Reprod. Fert., 1993.

Veronesi M.C., Bolis B., Faustini M., Rota A., Mollo A. *Biochemical composition of fetal fluids in at term, normal developed, healthy, viable dogs and preliminary data from pathologic littermates*. Theriogenology, 2018.

Verstegen JP. *Physiology and Endocrinology of Reproduction in Female Cats*. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*. BSAVA, 1998.

Wildt DE, Charman Guthrie S, Seager SWJ. *Ovarian and behavioral cyclicity of the laboratory maintained cat*, 2004.

Zambelli, Castagnetti, Belluzzi, Bassi, *Correlation between the age of the conceptus and various ultrasonographic measurements during the first 30 days of pregnancy in domestic cats (Felis catus)*. Theriogenology, 2002.

Zambelli, Castagnetti, Belluzzi, Paladini, *Correlation between fetal age and ultrasonographic measurements during the second half of pregnancy in domestic cats (Felis catus)*. Theriogenology, 2004.

Zambelli, Prati, *Ultrasonography for pregnancy diagnosis and evaluation in queens*, Theriogenology, 2006.