

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo 34

Settore Concorsuale: 07/H5 - CLINICHE CHIRURGICA E OSTETRICA VETERINARIA

Settore Scientifico Disciplinare: VET/10 - CLINICA OSTETRICA E GINECOLOGIA
VETERINARIA

RELAZIONE TRA ASPETTI MACRO E MICROSCOPICI DELLA PLACENTA E
ALCUNI PARAMETRI UTILI NELL'INDIVIDUAZIONE DI NEONATI CRITICI
ALLA NASCITA

Presentata da: Giulia Ballotta

Coordinatore Dottorato

Arcangelo Gentile

Supervisore

Daniele Zambelli

Co-supervisore

Carolina Castagnetti

Esame finale anno 2022

ABSTRACT:

Il periodo neonate corrisponde alle prime 4 settimane di vita. Il tasso di mortalità registrato, per la specie canina, in questo periodo è molto elevato e va dal 11,9% fino al 34%, con una percentuale maggiore registrata nella prima settimana di vita. Le cause di morte neonatale sono multifattoriali, in primis correlate al parto, in-breeding, difetti e malformazioni genetiche e teratogene, problemi legati alla madre, basso peso alla nascita e condizioni ambientali. Le malattie infettive (ed in particolare infezioni batteriche) rappresentano solo la seconda causa di mortalità. Inoltre i pazienti neonati sono piccoli e fragili, i mezzi e le risorse a disposizione del medico veterinario sono molto limitati se confrontati con quelli a disposizione per un soggetto adulto. Per questi motivi gli studi sono improntati all'individuazione di un valido sistema di monitoraggio del neonato alla nascita, così come già descritto in umana e per la specie equina, che permetta la pronta individuazione di neonati a rischio di mortalità nei primi giorni di vita al fine di poter intervenire tempestivamente fornendogli le cure necessarie per aumentarne la sopravvivenza. Ad oggi, tra tutti i parametri valutabili alla nascita, quattro sono quelli che ci possono dare un indicazione sulla criticità del neonato: il punteggio APGAR, la lattatemia, la glicemia e il peso. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare parametri ematici, quali glicemia e lattatemia, e clinici, quali indice APGAR e peso, ritenuti importanti al fine di stabilire la criticità del neonato intesa come maggiore probabilità di incorrere a morte nei primi giorni di vita, e parametri macro- e microscopici della placenta, in quanto organo fondamentale deputato allo sviluppo del conceptus e ad oggi poco studiato nella specie canina. Tra questi parametri, dallo studio emerge che il punteggio APGAR, che ci permette di definire la vitalità del neonato, e la lattatemia, che ci fornisce indicazioni sul grado di ipossia neonatale, risultato essere i principali parametri che permettono al clinico di individuare prontamente cuccioli che necessitano di più cure e pertanto fornirgli il supporto adeguato. Maggiori studi invece sono necessari al fine di poter andare a stabilire la relazione tra glicemia e sopravvivenza neonatale, e l'individuazione di un valore soglia che permetta di identificare prontamente un neonato ipoglicemico alla nascita. Interessante la relazione individuata tra la lattatemia, la glicemia e il peso del neonato. In particolare, neonati iperlattatemici sono risultati avere valori di glicemia maggiori e pesi minori rispetto ai neonati normolattatemici. Questo dato riflette la maturità del neonato, ovvero il basso peso alla nascita è associato ad un aumentato rischio di mortalità neonatale a causa dell'imaturità metabolica del paziente. Per quanto riguarda invece la valutazione dei parametri macro- e microscopici della placenta ulteriori studi sono necessari al fine di meglio stabilire la loro utilità come strumento prognostico per la sopravvivenza del neonato. Tuttavia, dal presente studio, è possibile concludere che le dimensioni della placenta, in particolare modo della parte funzionale (la parte zonata), sono correlate con il peso del neonato, così come già osservato in altre specie animali e in umana. Mentre dal punto di vista istologico ad oggi non si hanno sufficienti dati al fine di stabilire cosa è normale e cosa no, e soprattutto non si può stabilire quali siano le cause che determinano un tipo di lesione e l'impatto che essa può avere sulla morbilità neonatale. Un risultato di notevole interesse, infine, è stato quello di poter stabilire per la prima volta dei *range* di riferimento che permettano di definire un cucciolo neonato normo-peso alla nascita indifferentemente dalla taglia e/o razza d'appartenenza. Tale parametro è stato espresso come percentuale del peso del neonato rispetto al peso della madre. E, così come già descritto per la specie equina, questa ricerca ha permesso di individuare la percentuale di peso che la placenta di cane rispetto al peso del neonato dovrebbe avere per essere ritenuta normale.

*“C’è solo un modo per evitare le critiche:
non fare nulla, non dire nulla e non essere nulla.”*

Aristotele

*“La vita è breve, l’arte vasta, l’occasione fuggevole,
l’esperimento mal certo, il giudizio difficile”*

Ippocrate

INDICE

Introduzione	3
--------------	---

PARTE GENERALE

I neonati	7
1. Parametri di criticità alla nascita	8
1.1 APGAR score	8
1.2 Peso	11
1.3 Glicemia	14
1.4 Lattatemia	17
2. Placenta	19
2.1 Caratteristiche	21
2.3 Funzioni	24
2.3 Relazioni con i parametri del neonato	26

PARTE SPERIMENTALE

Obiettivi	30
Materiali e Metodi	31
1. Selezione della popolazione	31
2. La gestione del neonato e rilevamento sui dei parametri	33
3. La valutazione della placenta	36
4. Analisi dei dati	38
5. Analisi Statistica	41
Risultati	41
1. Studio di popolazione	41
2. Analisi degli studi statistici	52
Discussione	105
Conclusione	117

ALLEGATI

Allegato 1	119
Allegato 2	130
Allegato 3	131
Allegato 4	132
Allegato 5	133
Bibliografia	134

Introduzione

Il termine neonato deriva dal latino *natus*, si riferisce al nascituro nel periodo di vita che va dalla nascita fino al compimento della quarta settimana di vita. Nella specie canina, l'utilizzo di questa terminologia, permette di identificare il cucciolo nel periodo che intercorre tra la nascita e il momento dello svezzamento. Questa fase della vita è un periodo particolare e delicato, in quanto caratterizzato da uno stato fisiologico unico e da una serie di transizioni e maturazioni a cui va incontro l'organismo. In questo periodo è molto importante non considerare il neonato come un adulto in miniatura, ma approcciarlo in base alle sue caratteristiche specifiche. Per questo motivo la neonatologia veterinaria è un campo molto impegnativo e purtroppo per molti aspetti ancora ignoto. I pazienti neonati sono piccoli e fragili, i mezzi e le risorse a disposizione sono molto limitati se confrontati con quelli a disposizione per un soggetto adulto. Il riconoscimento di patologie congenite o acquisite, e di fattori che possono compromettere la sopravvivenza del paziente sono molto importanti. Ad oggi, la mortalità neonatale nella specie canina è alta, le percentuali riportate in letterature vanno dal 11,9% fino al 34% [1-5]. Le cause di morte sono multifattoriali, e correlate in primis a parti distocici, a stati di ipossia che si instaurano al momento della nascita, in-breeding, difetti e malformazioni genetiche e teratogeni, problemi materni, stato vaccinale della madre, basso peso alla nascita e condizioni ambientali [5, 6]. Le malattie infettive (ed in particolare infezioni batteriche) rappresentano solo la seconda causa di mortalità neonatale [5, 7]. Pertanto risulta importante l'individuazione di un valido sistema di monitoraggio del neonato alla nascita. Il quale deve essere caratterizzato da tecniche facili e rapide da usare per il medico veterinario, che fornisca risultati immediati ed in maniera minimamente invasiva per il paziente e che portino alla pronta identificazione di neonati che presentano un alto rischio di mortalità nei primi giorni di vita, così da poter intervenire tempestivamente con le cure adeguate con il fine di aumentare le probabilità la sopravvivenza.

Il principio di eseguire una valutazione della salute del neonato al momento della nascita non è un concetto nuovo, già 18 secoli fa nell'Antica Roma il filosofo medico greco Sorano di Efeso sotto l'impero di Traiano e Adriano lo descrive nel suo libro *Gyneacia* [8]. In esso

difatti si può trovare un capitolo riguardante a come prendersi cura del neonato, dove il filosofo, in 200 parole, spiega alle ostetriche come utilizzare la valutazione di quattro parametri legati al nascituro al momento del parto, con lo scopo di riconoscere i neonati sani e non rianimare o occuparsi degli altri, soprattutto se presentavano degli handicap, così come era d'usanza nell'Antica Roma [8]. Oggigiorno la valutazione del neonato alla nascita ha altri fini, ovvero individuare i neonati che necessitano cure al fine di fornirglielle. Per questo motivo in medicina umana, il neonato viene valutato attraverso il sistema di punteggio APGAR a 1 e 5 minuti dopo la nascita, e un esame fisico completo insieme a esami ematici di screening vengono eseguiti entro i primi giorni di vita con il fine di determinarne lo stato di salute [9]. In veterinaria, nei puledri alla nascita si esegue l'esame macroscopico della placenta e un sistema APGAR modificato viene utilizzato al fine di stabilirne la vitalità, successivamente si procede con la valutazione del trasferimento immunitario passivo durante il primo giorno di vita per identificare gli individui a rischio di asfissia o setticemia [10, 11]. Nella specie canina, purtroppo, un valido sistema di monitoraggio per l'individuazione di soggetti a rischio non è ancora stato individuato. Il punteggio APGAR (adattato per la specie canina) e la concentrazione dei lattati alla nascita, che riflette il livello di ossigenazione del neonato, sono gli unici parametri finora identificati in relazione con il rischio di morte del neonato entro le prime 24-48h di vita [12-15]. Oltre a questi, anche la glicemia e il peso alla nascita sono importanti fattori da tenere in considerazione in corso non solo di una visita neonatale ma anche al momento del parto. Ad oggi valori di riferimento pubblicati in merito alle concentrazioni di glucosio per il neonato variano ampiamente (88-133 mg/dl) [3, 16-18] e non è noto un valore di cut-off che permetta di stabilire se un neonato è da considerarsi ipoglicemico fin dal momento del parto prima dell'assunzione del colostro.

Per quanto riguarda il peso è noto essere un parametro che riflette la maturità relativa degli organi: un neonato sottopeso risulta fisiologicamente immaturo, più a rischio di ipotermia e fatica a competere all'interno della cucciolata per l'assunzione del latte, questo, in associazione al fatto che la gluconeogenesi è molto limitata a causa dell'imaturità epatica, lo predispone più facilmente a stati di ipoglicemia, e quindi ad un più alto rischio di morte [2, 3, 5, 19]. Inoltre a causa dell'alta variabilità morfologica presente tra le taglie e razze

della specie canina non abbiamo a disposizione delle tabelle riportanti il peso minimo che deve avere un neonato alla nascita per non essere definito sottopeso e neppure un parametro da poter valutare, indifferentemente dalla taglia e razza del soggetto, che fornisca anche indirettamente tale informazione.

Per quanto riguarda la placenta è noto che il suo stato influenza la salute del nascituro, in quanto organo fondamentale per il corretto sviluppo del feto, per una normale gravidanza e sempre influenzare la salute del nascituro. A fronte di questo in medicina umana la sua valutazione è una pratica routinaria [20], mentre in campo veterinario il suo esame è diventata pratica comune nelle procedure ostetriche nella cavalla dove si è visto che la percentuale di puledri malati è maggiore quando si osservano anomalie placentari [21-24], e studi analoghi sono stati condotti nella specie suina [25] e bovina [26]. Per quanto riguarda il cane, purtroppo ad oggi, quest'organo e la sua influenza sulla salute del neonato è ancora alquanto sconosciuta e pochi sono gli studi in merito.

Nella parte generale della presente tesi si offre una panoramica dei principali parametri ematici e clinici che ad oggi vengono utilizzati in corso di visita neonatale al momento della nascita e un descrizione della placenta canina, fornendo un contesto bibliografico al lavoro di ricerca eseguito e descritto in seguito.

Nella seconda parte del lavoro sono descritti i risultati dello studio sperimentale, i cui obiettivi sono quelli di indagare l'eventuale relazione esistente tra i parametri di criticità neonatale (indice APGAR, glicemia, lattemia e peso alla nascita) e gli aspetti macro- e microscopici della placenta. Inoltre vista la grande differenza morfologica e di pesi presenti all'interno della specie canina, il lavoro ha previsto l'individuazione di un range di riferimento che, indipendente dalla taglia e/o razza d'appartenenza, permetta di definire il normale peso di un neonato alla nascita e il normale peso che la placenta, considerata in toto (ovvero parte zonata, cordone ombelicale e membrane fetali) e come solo parte zonata, dovrebbero avere.

PARTE GENERALE

I neonati

Il termine neonato deriva dal latino *natus* e si riferisce al nascituro nel periodo di vita che va dalla nascita fino al compimento della quarta settimana di vita. L'utilizzo di questa terminologia per la specie canina è molto conveniente, ci permette di identificare il cucciolo nel periodo che intercorre tra la nascita e il momento dello svezzamento, che per l'appunto inizia al compimento della quarta settimana di vita.

Il periodo di vita neonatale corrisponde ad un periodo particolare e delicato per il neonato, caratterizzato da uno stato fisiologico unico e da una serie di transizioni e maturazioni a cui l'organismo va incontro che fanno sì che, il neonato, non possa essere considerato e trattato come se fosse un adulto in miniatura. Inoltre proprio queste sue peculiarità fanno sì che il neonato sia molto sensibile e delicato tanto da poter sviluppare rapidamente degli stati clinici e sindromi che possono rapidamente diventare fatali.

Il tasso di mortalità perinatale è elevato, in letteratura si parla di percentuali variabili che vanno dal 11,9% fino al 34% [5, 7, 27, 28]. Diversi sono i fattori che possono portare alla morte neonatale, tra le principali cause troviamo problemi al parto legati a parti distocici, a stati di ipossia che si instaurano al momento della nascita, in-breeding, difetti e malformazioni genetiche e teratogene, problemi materni, stato vaccinale della madre, basso peso alla nascita e condizioni ambientali. Le malattie infettive (ed in particolare infezioni batteriche) rappresentano solo la seconda causa di mortalità neonatale [5].

Il neonato si presenta fisicamente e fisiologicamente immaturo, questo unito alla sua taglia rende molto difficile sviluppare o adottare dei protocolli standard per la diagnostica, l'assistenza e terapia. Questo fa sì che la prevenzione e l'individuazione di parametri che ci permettono di meglio monitorare un neonato, di individuare coloro che possono necessitare fin dai primi minuti di vita di maggiori cure e attenzioni, ci permettono di abbassare almeno in parte il tasso di mortalità perinatale.

1. Parametri di criticità alla nascita

Ad oggi abbiamo a disposizione diversi parametri che si possono valutare, indifferentemente dal tipo di parto, eutocico o distocico che sia, con facilità, rapidità, poca invasività e senza troppe manipolazioni del neonato da parte dell'operatore, che ci permettono di individuare neonati che possono necessitare di più attenzioni non solo da parte del veterinario ma anche dall'allevatore, al fine di garantirne la sopravvivenza.

Tra questi, i principali parametri ad oggi utilizzati a tale scopo sono: APGAR score, peso alla nascita, glicemia e lattatemia.

1.1 APGAR score

APGAR Score è un sistema a punteggio, rapido, semplice ed affidabile che permette la valutazione mediante l'assegnazione di un punteggio della vitalità e della risposta alla rianimazione del neonato al momento della nascita e, pertanto, permette di individuare prontamente tutti quei soggetti critici che potrebbero necessitare di cure neonatali appropriate al fine di aumentare la percentuale di sopravvivenza.

Ideato tra il 1949 e 1952 dalla Dottoressa Virginia Apgar, medico e anestesista presso la Columbia University di New York, è stato reso pubblico per la prima volta nel 1953 [29] e standardizzato negli anni successivi [30, 31]. Ad oggi viene regolarmente utilizzato nella medicina umana per stabilire la condizione clinica del neonato subito dopo la nascita e si basa sulla valutazione di cinque parametri che si possono esaminare con facilità, senza la necessità di particolari attrezzature e senza interferire con la rianimazione/cura del paziente: 1) colore delle mucose (appearance), 2) frequenza cardiaca (pulse), 3) riflessi (grimace), 4) tono muscolare (activity) e 5) respirazione (respiratory effort) [31]. Ad ogni parametro viene assegnato un punteggio pari a 0-1-2, la somma dei singoli punteggi determina il punteggio APGAR che può essere compreso tra 0 e 10. L'APGAR score viene valutato a 1 e 5 minuti di vita e può essere rivalutato ad intervalli di 5 minuti per i successivi 20 minuti di vita in neonati che presentano un punteggio minore di 7 alla nascita [30, 32]. In figura 1 è riportato la scheda usata in medicina umana per la valutazione dell'APGAR score.

Apgar Score Gestational age _____ weeks

Sign	0	1	2					
				1 minute	5 minute	10 minute	15 minute	20 minute
Color	Blue or Pale	Acrocyanotic	Completely Pink					
Heart rate	Absent	<100 minute	>100 minute					
Reflex irritability	No Response	Grimace	Cry or Active Withdrawal					
Muscle tone	Limp	Some Flexion	Active Motion					
Respiration	Absent	Weak Cry; Hypoventilation	Good, Crying					
Total								

Comments:	Resuscitation					
	Minutes	1	5	10	15	20
	Oxygen					
	PPV/NCPAP					
	ETT					
	Chest Compressions					
	Epinephrine					

FIGURA 1: FORM DA COMPILARE PER LA VALUTAZIONE DELL'APPAGAR SCORE IN UMANA. OGNI PARAMETRO VA VALUTATO A SPECIFICI INTERVALLI DI TEMPO. IL FORM È COMPLETATO ANCHE CON L'EVENTUALE SEGNALAZIONE DI PARTICOLARI PROCEDURE DI RIANIMAZIONI CHE POSSONO RENDERSI NECESSARIE AL MOMENTO DELLA NASCITA [33].

Nell'uomo, un punteggio inferiore a 3 è generalmente considerato critico, da 4 a 6 è basso e superiore a 7 è considerato normale [30]. Un basso valore del punteggio APGAR significa che il neonato ha bisogno di particolari attenzioni mediche in quel momento e che necessità di rianimazione, ma questo non comporta per forza ripercussioni sulla vita futura del paziente. Tuttavia, si è osservato che un punteggio APGAR inferiore a 5 rilevato a 5 e 10 minuti dalla nascita è associato ad un aumentato rischio di paralisi cerebrale e il grado di anomalia è correlato al rischio di paralisi cerebrale, ciò nonostante la maggior parte dei neonati che presentavano un basso punteggio APGAR non hanno sviluppato paralisi cerebrale [33]. Qualora invece il punteggio rimanesse pari a zero, a 10 minuti dalla nascita, questo rappresenta un alto fattore di rischio di morte o disabilità future del neonato [33-35]. Ciò nonostante è importante ricordarsi che un punteggio APGAR che persiste basso non è un indicatore di compromissione intrapartum se preso da solo, oltre a non essere un indice di asfissia neonatale [33].

Solo nell'ultimo ventennio in medicina veterinaria, a seguito di modificazioni legate alla specie di destinazione, il sistema APGAR viene introdotto per la valutazione dei neonati al momento della nascita prima nei puledri, vitelli e suinetti [36-40] e solo nel 2009 viene pubblicato il primo lavoro da Veronesi et al. [12] inerente ai neonati di cane.

Così come in medicina umana ad ogni parametro viene assegnato un punteggio da 0 a 2 così come indicato in figura 2, e la somma dei singoli punteggi corrisponde al punteggio APGAR del neonato che può essere compreso tra 0 e 10. Neonati che presentano un punteggio compreso tra 0 e 3 vengono considerati critici, tra 4 e 6 moderatamente critici e con punteggio superiore a 7 normali [12, 14].

Parametro	Punteggio		
	0	1	2
Colore delle Mucose	cianotiche	pallide	rosa carico
Frequenza cardiaca	<180bpm	180-220 bpm	> 220 bpm
Irritabilità	assente	lieve reattività	normale reattività
Attività motoria	movimenti assenti	alcuni movimenti	movimenti attivi
Frequenza respiratoria	non piange/ <6atti/min	piange poco/ 6-15 atti/min	piange/ >15atti/min

FIGURA 2: METODO APGAR MODIFICATO PER LA VALUTAZIONE DEL NEONATO ALLA NASCITA IDEATO DAL GRUPPO DI STUDIO DI VERONESI ET AL. [12]

In umana il punteggio di Apgar non può essere utilizzato per misurare l'asfissia perinatale, ma dovrebbe invece essere considerato un metodo facile e rapido per valutare le condizioni generali e, in una certa misura, la vitalità del neonato immediatamente dopo il parto e l'efficacia della rianimazione [41]. In veterinaria, nei puledri, invece si è rivelato utile per la determinazione non solo della vitalità neonatale ma anche per il rilevamento dell'asfissia perinatale [38], e qualora utilizzato insieme ad altri parametri etologici e clinici legati alla specie di destinazione ha permesso una più efficiente valutazione dell'asfissia neonatale [36, 37, 39].

Nella specie canina, così come in umana, si è visto che il solo punteggio APGAR non può essere indicativo della vitalità del neonato [13]. Studi hanno dimostrato che cuccioli con un APGAR score compreso tra 0 e 3 alla nascita presentano nelle prime 24 ore di vita una probabilità di morte molto più elevato rispetto a punteggi maggiori [12, 13]. Al contrario, cuccioli che presentano un buon punteggio APGAR non presentano alcuna garanzia di sopravvivenza, ma hanno maggiore probabilità di sopravvivere [42]. Questi dati risultano in accordo con lo studio condotto da Casey et al in medicina umana [9].

Inoltre si è notato che il punteggio APGAR è relazionabile a alcune caratteristiche comportamentali del neonato come la ricerca della mammella e la presenza di un buon riflesso di suzione e deglutizione [12].

Più recentemente il gruppo di studio di Batista et al [42] ha formulato un sistema APGAR modificato per la valutazione di neonati di razze brachicefaliche, in particolare Bulldog Inglese e Francese, in quanto ritenuti cuccioli che per esigenza di razza richiedono, in misura maggiore, più attenzione e cure più intensive durante alla prime ore di vita. Questo sistema di punteggio APGAR modificato per razze brachicefalie (figura 3) permette l'individuazione di tre classi di neonati in base al punteggio finale ottenuto: critici con punteggio APGAR compreso tra 0-3, moderatamente critici tra 4-6, normali superiore a 7, così come stabilito da Veronesi et al [12, 14] ma presenta alcune variazioni legate alla valutazione di alcuni parametri quali la frequenza cardiaca e il colore delle mucose rispetto al sistema proposto da Veronesi et al [12].

Parametro	Punteggio		
	0	1	2
Colore delle Mucose	cianotiche/pallide	rosa	rosa carico
Frequenza cardiaca	<120bpm	120-180 bpm	> 180 bpm
Irritabilità	assente	lieve reattività	normale reattività
Attività motoria	movimenti assenti	alcuni movimenti	movimenti attivi
Frequenza respiratoria	<6atti/min	6-15 atti/min	>15atti/min

FIGURA 3: PUNTEGGIO APGAR MODIFICATO PER RAZZE BRACHICEFALIE (BULLDOG INGLESE E FRANCESE) PER LA VALUTAZIONE DEL NEONATO ALLA NASCITA IDEATO DAL GRUPPO DI STUDIO DI BATISTA ET AL. [42]

1.2 Peso

Il peso alla nascita, oltre ad essere un parametro facile da valutare mediante l'utilizzo di bilance digitali (figura 4), è un importante indicatore di sopravvivenza nella maggior parte delle specie domestiche e nell'uomo [2, 43-50]. Difatti, si è osservato che neonati con un basso peso alla nascita presentano un rischio di morte maggiore nelle prime 48 ore di vita rispetto a neonati normo peso [43, 45, 46, 49]. In umana [43, 45] e nella specie suina [46] il

basso peso alla nascita sembra rappresentare un fattore di rischio per l'insorgenza di ipoglicemia e ipotermia. Nella specie canina si è visto che, neonati con un basso peso alla nascita presentano un rapporto superficie e massa corporea più elevato rispetto agli altri della cucciolata normo peso, e questo sembra comportare una ridotta capacità di mantenere stabile la concentrazione di glucosio nel sangue e la temperatura corporea, e conseguentemente presentano una minore capacità di suzione. Questi fattori, presi insieme, aumentano il rischio di morte neonatale [3, 50]. In particolare alcuni studi hanno dimostrato che neonati che nascono con un basso peso presentano un rischio di mortalità dodici volte maggiore rispetto ai neonati di peso normale [49, 51].



FIGURA 4: ESEMPIO DI BILANCE DIGITALI PER LA PESA DEL NEONATO. A SINISTRA UNA BILANCIA DIGITALE DA CUCINA A DESTRA UNA BILANCIA PESA NEONATI

Purtroppo ad oggi nella specie canina, a causa dell'alta variabilità morfologica presente tra le taglie e razze, non abbiamo a disposizione tabelle o dati che ci permettano di conoscere il corretto peso alla nascita che un neonato dovrebbe avere al fine di essere definito normale. Oggigiorno possiamo supporre che il peso medio alla nascita per razze di piccola taglia è di 120 grammi (100-200 grammi), di 250 grammi (200-300 grammi) per la media, 490 grammi (300-500 grammi) per la grossa taglia e 625gr per razze giganti [52]. Inoltre si è osservato che, confrontando il peso alla nascita in termini di percentuale, ovvero confrontando il rapporto esistente tra il peso del neonato e il peso della madre, cuccioli appartenenti a razze di grossa taglia presentano un peso alla nascita minore rispetto a cuccioli appartenenti a razze di piccola taglia [53, 54]. Sarebbe però opportuno, visto la significativa differenza esistente tra le varie razze, riuscire a stabilire dei valori soglia specifici per ognuna di esse

[49, 54, 55]. Ad oggi, un neonato viene definito avere un peso basso alla nascita qualora esso risulti essere inferiore del 25% rispetto al peso medio della cucciolata [49].

Il peso alla nascita, nella specie canina, sembra essere influenzato da diversi fattori tra cui in primis, così come già osservato nei gatti [56, 57], abbiamo la dimensione della cucciolata e l'effetto cucciolata [6, 47, 49, 54, 58]. Ovvero cucciolate di dimensioni maggiori presentano cuccioli con un peso medio minore, cucciolate di piccole dimensioni presentano pesi maggiori [54] anche se, nello studio condotto dal gruppo di Tesi et al [59], la dimensione della cucciolata non sembra aver nessun effetto sul peso del nascituro. Altri fattori che sembrano influenzare il peso alla nascita sono lo stato di salute e nutrizione della madre, infezioni in atto e l'ambiente [6]. Non influiscono invece il sesso del nascituro, la durata della gestazione e fattori materni quali età, parità e taglia della madre [47, 49, 54, 58]. Per quanto riguarda l'influenza dei fattori materni sul peso alla nascita, in particolare l'età della madre, esistono studi contraddittori. Difatti Lawler [6] lo indica tra i fattori che influenzano il peso del nascituro, in accordo con quanto osservato nella specie equina dove si è visto che il peso del puledro aumenta di 0,5kg per ogni anno in più che presenta la fattrice [22]. Mentre nello studio condotto da Mila et al [49] e Mugnier et al [58] il peso alla nascita non sembra essere correlato con nessun fattore materno.

Nella specie felina [6] e suina [46], si è visto che l'inadeguata nutrizione intrauterina del feto comporta un basso peso alla nascita. Nei suinetti questa situazione esita nel ritardo di crescita intrauterina che non sembra essere legato ad un minor spazio a livello uterino ma bensì ad una ridotta dimensione della placenta che comporta un ridotto apporto nutrizionale dalla madre al feto [60]. Situazione simile è stata descritta nella donna e prende il nome di ritardo di crescita fetale, e sembra essere associato sia ad una insufficiente concentrazione di nutrienti nel circolo materno che da patologie vascolari in almeno il 35% dei casi [61]. Ad oggi nella specie canina non è ancora del tutto noto l'impatto che può avere un eventuale disordine placentare sul peso alla nascita del neonato. Primi studi sono stati condotti da gruppo di Tesi et al [59, 62], dove hanno osservato che in razze di piccola taglia, neonati con un basso peso alla nascita presentano una placenta più leggera, un'area placentare totale, un'area di trasferimenti e un'area vascolare totale più piccola rispetto a cuccioli di peso

normale. Ma ulteriori studi sono ancora necessari al fine di chiarire meglio il meccanismo sottostante.

1.3 Glicemia

La glicemia è un parametro che si può ottenere in maniera rapida e poco invasiva mediante l'utilizzo di glucometri veterinari o umani ma validati per la specie canina (figura 5) e una goccia di sangue ottenuta pungendo il cuscinetto plantare del neonato con un ago sterile.



FIGURA 5 ESEMPI DI GLUCOMETRI VALIDATI PER LA SPECIE CANINA. PARTENDO DA SINISTRA: OPTIUM XCEED, ALPHATRAK2, ELITE

La glicemia corrisponde alla concentrazione di glucosio presente nel circolo ematico, che rappresenta la principale fonte energetica per il neonato. Al momento della nascita il neonato deve passare dal supporto placentare alle riserve endogene per la produzione di glucosio e, visto che nascono con un contenuto corporeo di grasso molto basso (indicativamente si calcola il 1,3% del peso corporeo [63]), molta dell'energia utilizzata proviene dalla glicogenolisi prima e poi da una miscela di glicogenolisi e gluconeogenesi [64, 65].

Il livello di glucosio nel sangue è regolato e mantenuto da tre principali meccanismi: assorbimento intestinale, produzione epatica ed in piccola parte dalla produzione renale [66]. Nel neonato, dove gli organi alla nascita sono ancora immaturi, soprattutto il fegato, c'è una ridotta capacità di gluconeogenesi e glicogenolisi [66-68]. Pertanto in questi soggetti, la maggior parte del glucosio disponibile è ottenuta attraverso l'ingestione, e questo fa sì che il neonato si presenti particolarmente sensibile ad incorrere in stati di ipoglicemia conseguente a stress o malattia in quanto l'organismo va in contro ad un maggiore consumo energetico, oppure perché non mangia in quantità adeguata e conseguentemente non assume energia sufficiente [66].

Inoltre, rispetto all'adulto, il neonato presenta un fabbisogno di glucosio molto maggiore ma metabolicamente parlando, a causa dell'imaturità epatica tipica di questa età, è in grado di produrne solo una piccola quantità rispetto a quello che gli serve [67-69]. Studi hanno dimostrato che durante il digiuno le riserve di glicogeno presenti a livello muscolare ed epatico diminuiscono molto velocemente [65], tuttavia queste riserve sono in grado di mantenere livelli di glicemia abbastanza stabili in neonati appena nati posti a digiuno fino ad un massimo di 24 ore [70]. Però, una volta esaurite le riserve corporee di glicogeno, la capacità di mantenere uno stato normoglicemico è molto limitata [5].

È noto che complicazioni nel peri- e post-partum, quali insufficienze placentari, prematurità, ipossia, scarsa produzione latte o agalassia da parte della madre, possono predisporre il neonato a problemi di ipoglicemia [6]. Un altro fattore che sembra predisporlo ad un più alto rischio di sviluppare ipoglicemia è il peso corporeo alla nascita, fattore che già nei suinetti è stato dimostrato essere un fattore di rischio per lo sviluppo di ipoglicemia e ipotermia con conseguente predisposizione alla morte [43, 45, 46]. È noto che neonati che nascono con un basso peso alla nascita presentano un alto metabolismo e questo si traduce in un maggiore consumo e richiesta di energia da parte dell'organismo [5]. Inoltre presentano un alto rapporto superficie corporea / massa corporea rispetto agli altri neonati della cucciolata e le dimensioni del fegato sono minori e pertanto le riserve epatiche di glicogeno sono minore, tutto questo si traduce in una ridotta capacità di mantenere stabile le concentrazioni di glucosio ematico e predispongono ad ipoglicemia [3, 5].

I segni clinici legati all'ipoglicemia sono letargia, l'incapacità di alimentarsi, riflesso di suzione debole o assente, depressione o stupor, convulsioni, tremori, nervosismo, vocalizzazioni afinalistiche, irritabilità e talvolta può portare alla morte [69, 71].

Nonostante l'ipoglicemia è riportata insieme all'ipotermia tra le principali cause di morte neonatale [5, 6, 72], ad oggi in letteratura troviamo range di glicemia nel neonato molto variabili. Per un neonato, si parla di valori di glicemia normale se compresi tra 88-133 mg/dl [3, 73, 74], mentre c'è chi sostiene che durante la prima settimana di vita è normale osservare variazioni di glicemia comprese tra 52 mg/dl e 127 mg/dl e dove viene considerato 40 mg/dl la soglia per definire un neonato ipoglicemico [5, 6], altri studi invece sostengono che nei primi 1-3 giorni di vita i valori normali di glicemia oscillano tra 76-155

mg/dl [66]. In molte specie nelle prime ore di vita sono stati osservati bassi valori di glicemia, che hanno poi raggiunto i valori normali o sovrapponibili a quelli dell'adulto nel giro delle prime 24h a seguito dell'assunzione dell'alimento [50]. In particolare si è osservato che in umana la glicemia alla nascita risulta spesso inferiore a 50mg/dl ma dopo le prime 24 ore di vita raggiunge valori pari a 81 mg/dl [16]. Nel puledro e nel vitello abbiamo una situazione analoga: nel primo si osservano valori pari a 75 mg/dl alla nascita che a seguito dell'ingestione dell'alimento raggiungono valori di 135 mg/dl [18], nei secondi invece abbiamo glicemie di 65 mg/dl alla nascita e dopo il primo giorno di vita valori pari a 120mg/dl [75]. Ad oggi, per la specie canina, esistono due studi che permettono di dare un'indicazione più precisa del valore della concentrazione ematica della glicemia nel neonato nelle prime 24 ore di vita:

- Mila et al. [50] che con il loro studio consigliano di valutare la glicemia nel neonato al fine di individuare cuccioli che presentano un maggior rischio di morte insieme all'APGAR score. Evidenziando che nelle prime 24 ore di vita la glicemia di neonati sani passa da 98 mg/dl a 120 mg/dl, dato in accordo con i precedenti studi condotti da Rosset et al. [73], mentre cuccioli morti entro le 24ore di vita presentavano una concentrazione media di glucosio a circa 8 ore dopo la nascita di 37 mg/dl (rispetto ai 98 mg/dl dei cuccioli sopravvissuti), questo basso valore è in accordo con la definizione data da Lawler [6] di neonato ipoglicemico e lo associano ad un esaurimento delle riserve energetiche da parte dell'organismo associato ad una mancanza assunzione di colostro.
- Ballotta et al [76], misurando, in funzione dell'indice APGAR, la glicemia alla nascita in cuccioli nati mediante taglio cesareo in assenza di segni di sofferenza fetale, da madri normoglicemiche e sane, prima dell'assunzione di colostro hanno individuato il valore di 73 mg/dl come concentrazione soglia per definire un neonato normo- o ipoglicemico.

1.4 Lattatemia

Il lattato ematico è un parametro di grande utilità in medicina umana e veterinaria, viene utilizzato nel monitoraggio di diverse patologie grazie alla sua validità prognostica e rapidità con cui si modifica in funzione delle condizioni cliniche del paziente [15, 77]. Inoltre grazie alla possibilità di poterlo misurare mediante l'utilizzo di analizzatori portatili (figura 6) la sua rivelazione risulta rapida, economica e poco invasiva [15].



FIGURA 6: ANALIZZATORE PORTATILE LACTATE SCOUT PER LA LATTATEMIA, VALIDATO IN DIVERSE SPECIE ANIMALI, NEL CANE È STATO VALIDATO NEL 2007 DA FERASIN ET AL. [78]

Il lattato viene prodotto principalmente in corso di glicolisi anaerobica, tuttavia una piccola quantità deriva dal metabolismo aerobico [77]. Nell'adulto valori normali di lattatemia risultano compresi tra 0,3 e 2,5 mmol/l [77], mentre nel neonato è normale osservare valori più elevati che decrescono fino a raggiungere i valori osservati nell'adulto attorno ai 2-3 mesi d'età [79]. Questi valori elevati osservati in età neonatale trovano molteplici motivazioni tra cui il fatto che il lattato è una fonte di energia utilizzata dal cervello in corso di ipoglicemia e che la gluconeogenesi epatica è molto limitata a causa dell'imaturità del fegato [79].

In campo ostetrico, umano e veterinario, il lattato rappresenta un marker di distress fetale e/o neonatale [15]. Stati di iperlattatemia indicano l'utilizzo di vie secondarie di ossigenazione conseguenti ad eventi ipossici che si verificano durante il parto. Difatti l'apporto di ossigeno al feto, durante il parto, viene interrotto e questo comporta l'instaurarsi una un'importate acidosi metabolica. In umana la misurazione del lattato

durante il travaglio e il parto stesso viene considerato un ottimo metodo al fine di stabilire l'ipossia fetale intra-partum [80, 81]. Nella specie canina, ad oggi, l'esatto ruolo dei lattati nel neonato è controverso ed esistono studi contrastati sulla sua reale funzione.

Nello studio condotto da Groppetti et al [13] e Castagnetti et al [15] si è osservato che la lattatemia misurata alla nascita, se associata ad altri valori prognostici come l'APGAR, può essere considerato un buon indice prognostico per l'individuazione di cuccioli che presentano una maggiore probabilità di morire nelle prime 48 ore di vita. Difatti questi due studi hanno osservato che cuccioli vivi a 24-48h presentavano alla nascita un buon APGAR score e bassi valori di lattatemia se paragonati con neonati morti. In contrasto con questo, Mila et al [50] non solo non osservano una correlazione tra l'APGAR score e la lattatemia, ma neppure una relazione tra la lattatemia e la mortalità neonatale nelle prime 24 ore di vita. Mila et al giustificano questi risultati con il fatto che al momento della nascita si viene ad instaurare nel neonato un'acidosi spontanea e questo giustificerebbe il fatto che la lattatemia non può essere presa in considerazione come parametro per stabilire il grado di acidosi metabolica nel neonato [50].

Il gruppo di Groppetti et al [13] ha inoltre individuato un valore soglia pari a 5 mmol/l che permette di distinguere neonati sani (normolattatemicici, con valori < 5mmol/l) da neonati con distress (iperlattatemicici, con valori > 5 mmol/l). Dato in disaccordo con i risultati ottenuti da un recente studio pubblicato nel 2021 dove non è stato possibile osservare la validità di questo valore di cut off [82].

In fine la lattatemia del nascituro, così come già osservato in medicina umana [83], sembra essere influenzata dal tipo di parto: neonati nati da taglio cesareo elettivo presentano valori di lattatemia minori, quelli nati da parto naturale valori maggiori, mentre valori critici sono stati osservati in corso di tagli cesarei d'urgenza, dove lo stress fetale può essere conseguente alla distocia o all'effetto ipossico-ischemico che le contrazioni uterine esercitano sui vasi placentari, l'anestesia, l'ipotensione materna ed l'ipovolemia [13].

2. Placenta

La placenta è stata studiata fin dall'antichità, la parola placenta in latino significa torta, questo termine deriva dal fatto che in tempi antichi si pensava che la placenta avesse l'aspetto di una torta a forma d'imbuto piatta. Inoltre si credeva che la sua struttura fosse uguale per tutti i mammiferi, tant'è che lo stesso Leonardo da Vinci disegnò un feto umano all'interno di una placenta di un ruminante (figura7) [84, 85].

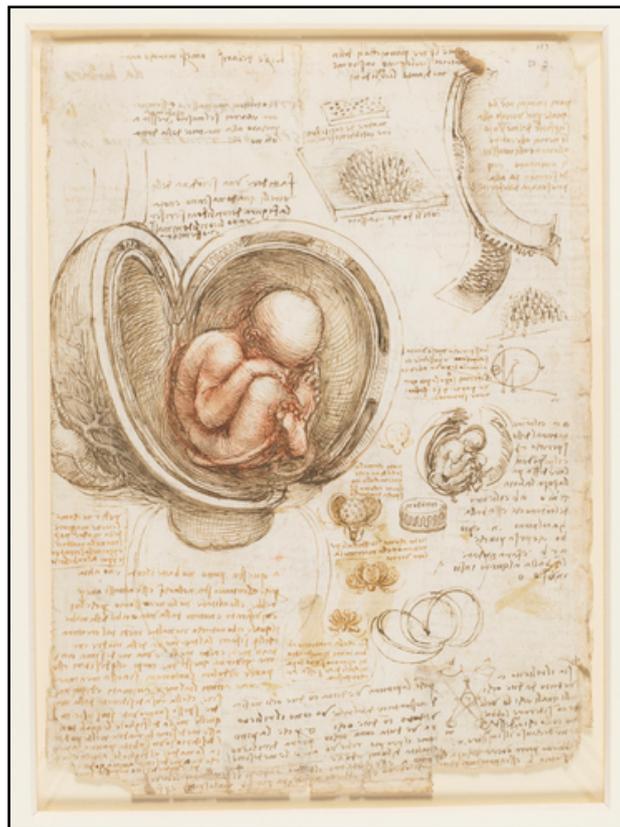


FIGURA 7: RAPPRESENTAZIONE DI LEONARDO DA VINCI DEL FETO UMANO E DELLA SUA PLACENTA RIPORTATA NEL FOGLIO 18 DEI QUADERNI DI ANATOMIA CONSERVATI PRESSO IL ROYAL COLLECTION TRUST DI BUCKINGHAM PALACE [IMMAGINE TRATTA DAL SITO DEL ROYAL COLLECTION TRUST - [HTTPS://WWW.RCT.UK/COLLECTION/919102/THE-FETUS-IN-THE-WOMB-SKETCHES-AND-NOTES-ON-REPRODUCTION](https://www.rct.uk/collection/919102/the-fetus-in-the-womb-sketches-and-notes-on-reproduction)]

Ad oggi, sappiamo che esiste una sorprendente diversità tra le varie specie, non solo rispetto a come avviene il processo di placentazione ma anche per l'architettura finale assunta dalla placenta. La stessa definizione di placenta ha subito delle modificazioni negli anni, Mossman nel 1937 [86] la definisce come un apposizione tra il tessuto parentale materno e quello fetale con lo scopo di permettere degli scambi fisiologici tra le due parti. Mentre nel 1975 Steven e Morris [87] descrivono la placenta dei mammiferi euteri come una struttura data dalla disposizione di uno o più epiteli di trasporto che separano la circolazione fetale e

da quella materna. Ad oggi definiamo la placenta come un organo multifunzionale endocrino temporaneo, necessario per lo sviluppo del conceptus, che rappresenta l'interfaccia madre-feto ed è il vettore responsabile degli scambi gassosi e dei nutrienti.

In base alle diverse caratteristiche macroscopiche ed istologiche, nel corso degli anni, sono stati proposti diversi schemi di classificazione placentare, in particolare la placenta può essere classificata in funzione:

- del tessuto extraembrionale coinvolto nella placentazione;
- dell'interazione esistente tra la superficie corio-allantoidea e l'endometrio materno;
- del numero di tessuti fetali e materni che vanno a costituire la barriera placentare, ovvero che separano il sangue materno dal conceptus (si parla di classificazione istologica);
- del tessuto materno che si viene a perdere al momento del parto.

In base queste classificazioni la placenta dei carnivori, e quindi della specie canina, viene definita una placenta decidua, endoteliochoriale, zonata, con una membrana corio-allantoidea a forma labirintica [88-90]. In figura 8 è riportato l'aspetto schematico della placenta di una cagna.

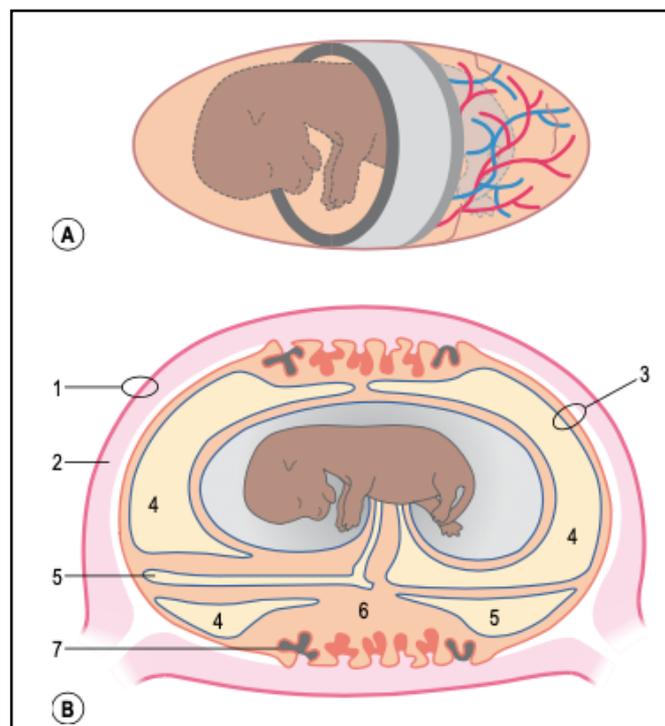
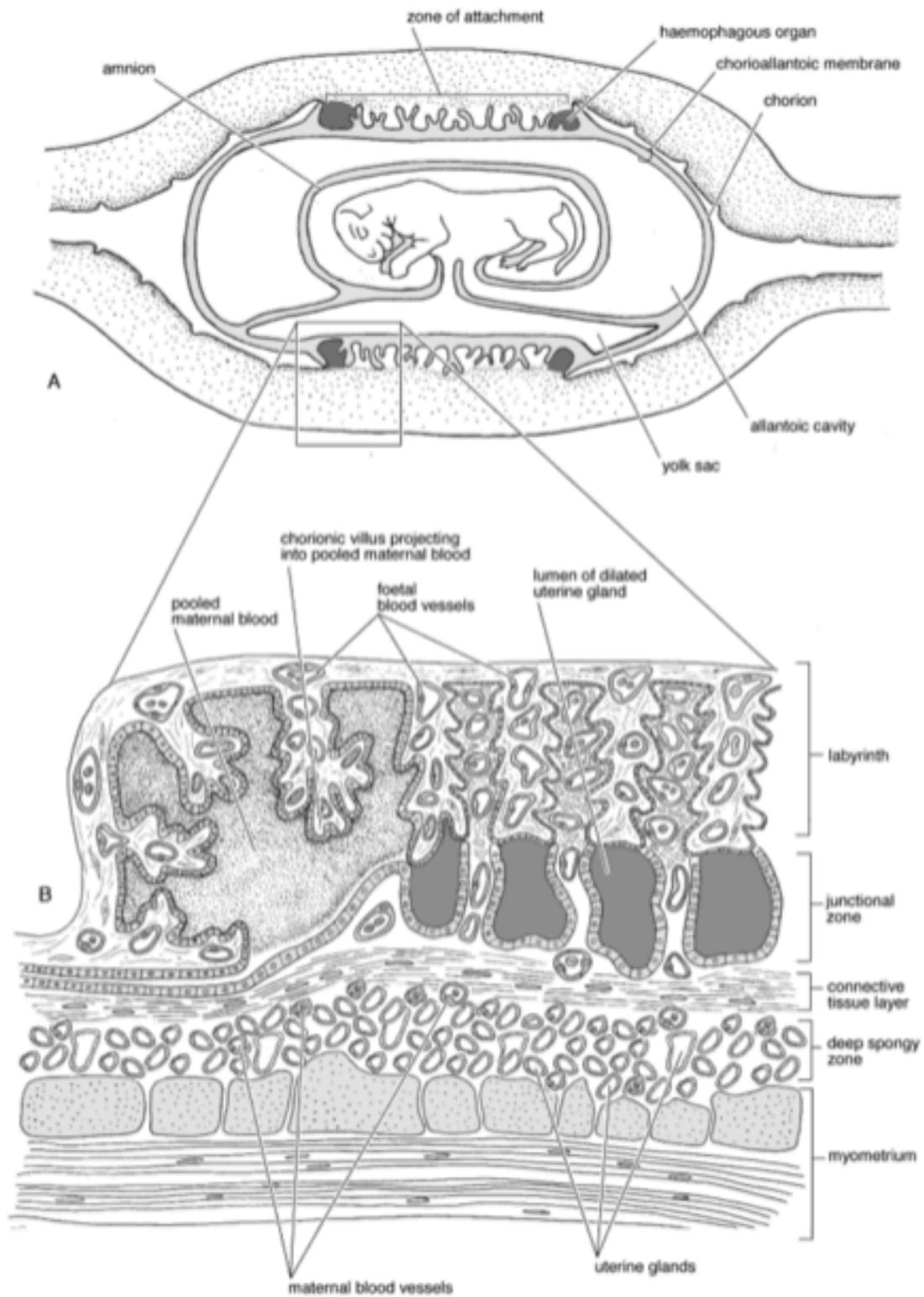


FIGURA 8: IMMAGINE SCHEMATICA DELLA PLACENTA DI CAGNA.
1: PERIMETRIUM, 2: ENDOMETRIO E MIOMETRIO, 3: TESSUTO CORIO-ALLANTOIDEO, 4: ALLANTOIDE, 5: SACCO VITELLINO, 6: LAMELLE DEL TESSUTO CORIO-ALLANTOIDEO CHE SI VENGONO A FORMARE A LIVELLO DELLA PORZIONE ZONATA, 7: EMATOMA MARGINALE.
IMMAGINE TRATTA DA "ESSENTIAL OF DOMESTIC ANIMALS EMBRYOLOGY" [91]

2.1 Caratteristiche

Il processo di placentazione nella specie canina inizia circa attorno al 14° giorno di gestazione grazie all'apposizione di tessuto materno (endometrio) e fetale (corion) e porta alla formazione della placenta corio-vitellina [92, 93]. Questa struttura svolgerà la funzione di organo respiratorio e di scambio dei nutrimenti per l'embrione fino a circa la 4° settimana di gestazione [92, 94]. Dopo il 20° giorno di gravidanza la placenta corio-vitellina verrà sostituita dalla placenta corio-allantoide, che è caratterizzata macroscopicamente dalla distribuzione dei villi in maniera uniforme su una banda equatoriale che circonda il feto. La distribuzione dei villi permette di definire la placenta dei carnivori come zonata [94]. A livello di questa cintura, l'interfaccia materno-fetale è di tipo lamellare con proiezioni fetali che si interdigitano con i setti materni in modo complesso e contorto e ha lo scopo di aumentare la superficie di contatto tra la madre e il feto, questa struttura prende il nome di placenta labirintica [93]. Durante l'ultimo terzo della gravidanza, la placenta labirintica e la densità dei capillari in essa contenuta aumenta drasticamente, questo sembra essere legato al fatto che dal 45° giorno di gravidanza in poi il feto richiede un maggiore apporto nutritivo al fine di completare il suo sviluppo [93]. L'intima connessione materno-fetale della placenta comporta una perdita di tessuto uterino al momento del parto, pertanto la placenta del cane è definita decidua [95].

In figura 9 è riportato lo schema della struttura di una placenta di cane con le sue componenti materne e fetali, mentre in figura 10 e 11 si può osservare rispettivamente il suo aspetto macroscopico, di un preparato fissato in formalina, ed istologico.



**FIGURA 9: SCHEMA DEI TESSUTI, MATERNI E FETALI, COSTITUENTI LA PLACENTA DI UN CANE
IMMAGINE TRATTA DA "VETERINARY EMBRIOLOGY" [92]**

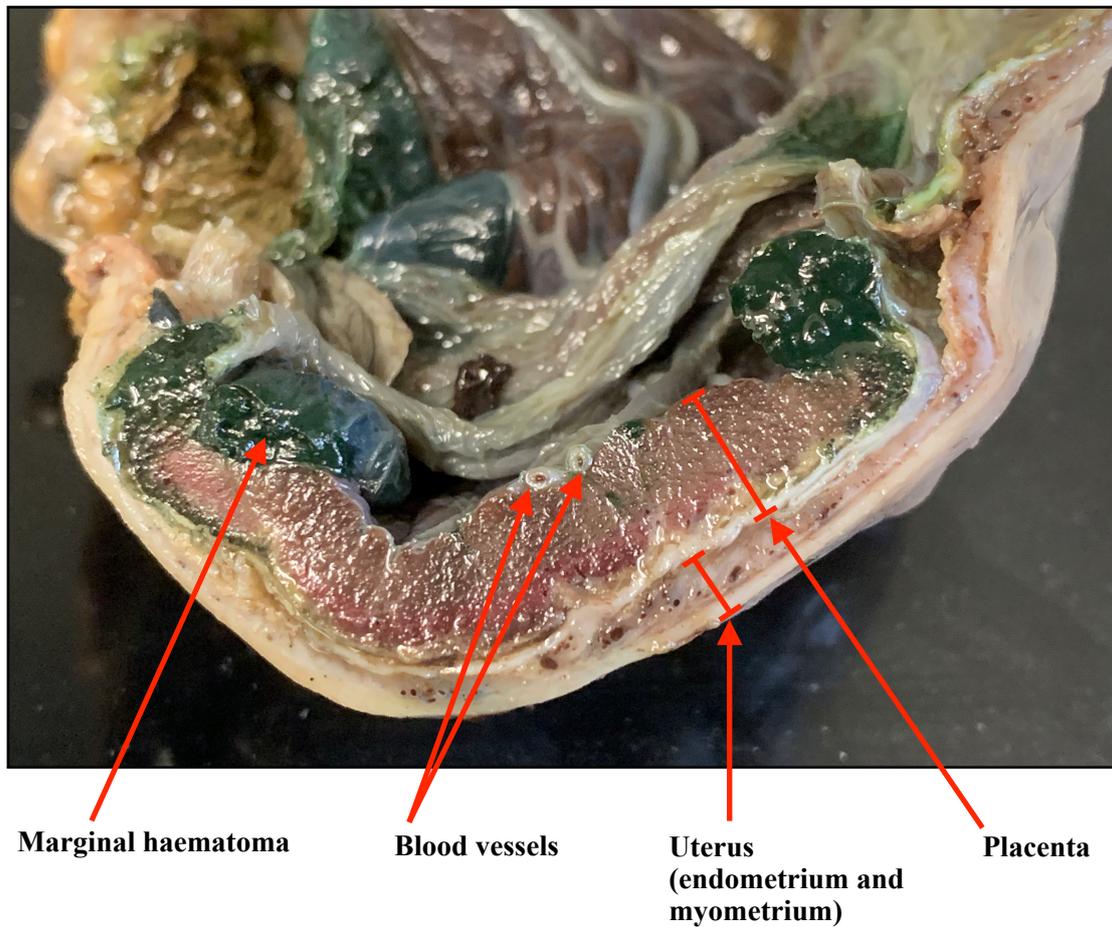


FIGURA 10: IMMAGINE MACROSCOPICA DI UN PREPARATO FISSATO IN FORMALINA DI PLACENTA E UTERO DI CANE DOVE SI POSSONO VISUALIZZARE LE COMPONENTI MATERNE E FETALI COINVOLTE.

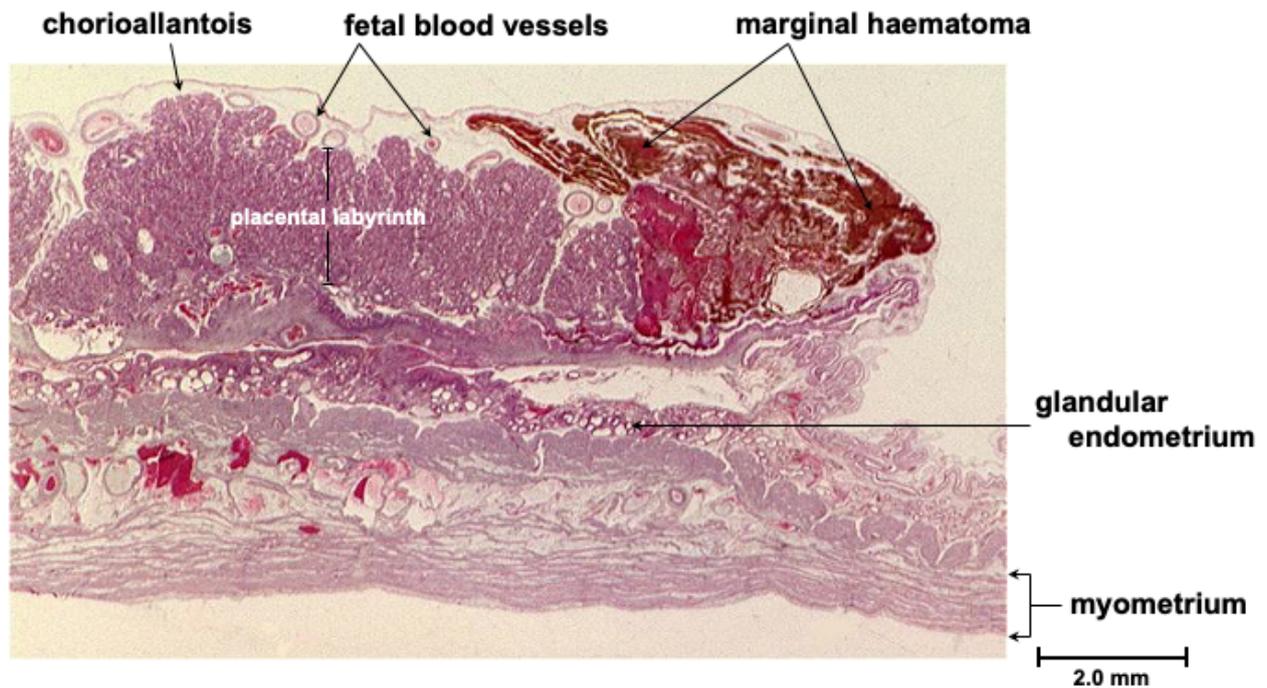


FIGURA 11: IMMAGINE ISTOLOGICA A BASSO INGRADIMENTO DELLA PLACENTA CANINA DOVE SI POSSONO VISUALIZZARE LE COMPONENTI MATERNE E FETALI COINVOLTE. IMMAGINE MODIFICATA DA LECTURES BY PROF DC. WATHES - VETERINARY ROYAL COLLEGE

Tra il 22° e 25° giorno di gestazione, è possibile osservare la formazione degli ematomi marginali che si vengono a trovare su entrambi i lati della parte zonata della placenta. Queste strutture originano dallo stravasamento di sangue dai capillari materni che si deposita, successivamente, come canali ematopoietici stagnanti tra l'endometrio e il trofoblasto [93]. L'ematoma marginale, nella cagna, assume un colore verdastro dato dalla natura dei prodotti derivati dalla demolizione dell'emoglobina.

2.3 Funzioni

La placenta è responsabile del trasporto dei nutrienti, gas e materiale di scambio oltre che per la comunicazione feto-materna, inoltre è un organo endocrino e gioca un importante ruolo di filtro selettivo bloccando o consentendo i trasferimenti di determinate molecole dalla madre al feto [85, 92, 96, 97].

Gli ormoni prodotti dalla placenta servono come moderatori per la comunicazione tra il conceptus e la madre, e a seconda della specie, la placenta può produrre una grande varietà di ormoni [85, 96]. Tuttavia, nonostante questa diversità, una caratteristica comune a tutte le specie è legata al fatto che tali ormoni servono per creare un ambiente materno favorevole per lo sviluppo del conceptus stesso [96]. Tant'è che il feto presenta differenti antigeni di istocompatibilità dalla madre, ciononostante non viene rigettato dal corpo materno. Questo sembra essere legato al basso profilo antigienico che l'embrione prima, e successivamente il feto, mantengono al fine di evitare il riconoscimento immunologico da parte della madre con conseguente rischio di rigetto come allotrapianto [92]. Ad oggi non sono ancora del tutto chiari i meccanismi che comportano la mancata risposta immunitaria materna nei confronti del conceptus, ma sembra che la placenta e i suoi involucri giocano un ruolo importante [92].

Nella specie canina durante la vita embrionale, dalla seconda alla quarta settimana di gestazione circa, la placenta corio-vitellina svolge le funzioni di organo respiratorio e di scambio di nutrimenti, successivamente, durante la vita fetale, tale funzione sarà a carico della placenta corio-allantoidea. Ciononostante il sacco vitellino, nonostante vada incontro ad una regressione non scompare completamente e continuerà ad essere un importante sito di eritropoiesi fino alla fine della gravidanza [92].

La funzione di scambio è strettamente legata alla crescita fetale, con una correlazione positiva tra il peso fetale e peso placentare, il rapporto che esiste tra questi due pesi si riflette per l'appunto sull'efficacia complessiva della placenta stessa [97, 98].

Attraverso la placenta non è possibile lo scambio di tutte le molecole, difatti la sua selettività non consente il passaggio delle cellule ematiche così come pure le molecole ad alto peso molecolare come ad esempio i fosfolipidi e le proteine [92, 97], quest'ultime verranno sintetizzate direttamente dall'embrione a partire da precursori più semplici (glucosio, aminoacidi, acidi grassi) per i quali la barriera è permeabile [99]. Tali precursori e tutte le molecole che come loro presentano un basso peso molecolare attraversano la barriera placentare mediante diversi meccanismi: si parla di diffusione semplice per ossigeno, anidride carbonica, acqua, urea ed elettroliti, diffusione facilitata per glucosio e aminoacidi, trasporto attivo elettroliti, lipidi e vitamine, poi abbiamo la fagocitosi e pinocitosi [92, 97, 99].

Attraverso la placenta possono inoltre passare virus, batteri, protozoi e tutti quei farmaci che presentano un basso peso molecolare, ovviamente questo può rappresentare un problema per tutte quelle molecole che hanno effetto teratogeno sul feto [92].

Il limitato trasferimento transplacentare di macromolecole fa sì che il passaggio di anticorpi materni sia molto scarso, tant'è che i cuccioli nascono con un'immunità sistemica molto bassa, con una concentrazione sierica media di IgG di circa 0,3 g/L contro 8-25 g/L rilevate nell'adulto [100]. Il trasferimento dell'immunità passiva dalla madre alla prole avviene successivamente alla nascita mediante l'assunzione del colostro [100].

Per quanto riguarda i liquidi amniotico e allantoideo la loro funzione non è ancora del tutto nota [101]. Nel 1651, Sir William Harvey scrisse che il liquido amniotico è “come il colliquamento nell'uovo di gallina, è un fluido destinato dalla natura al nutrimento del feto” [102]. Oggi è ormai noto che tale liquido non svolge solamente una funzione nutritiva per il conceptus ma, permettendone il galleggiamento, svolge un'importante funzione di protezione dello stesso da parte di urti o compressioni, ne previene l'adesione con il foglietto amniotico e ne stimola la crescita simmetrica, inoltre lo mantiene idratato, collabora per mantenere la temperatura corporea costante e gioca un ruolo vitale nello sviluppo dei polmoni e degli altri organi [96, 103].

Anche l'ematoma marginale sembra avere una sua funzione, ovvero quella di rappresentare una fonte di ferro per i processi di emopoiesi del feto. E al fine di mantenere tale funzione, affinché il sangue permanga in situ e rimanga fluido, la componente materna opera su di esso un minimo drenaggio mentre il corion produce sostanze che ne evitano la coagulazione [96].

2.3 Relazioni con i parametri del neonato

La formazione della placenta, in quanto organo adibito allo scambio di nutrimento, ossigeno e altre sostanze tra la madre e il feto, è fondamentale per il corretto sviluppo del feto stesso e per una normale gravidanza.

In medicina umana la valutazione della placenta è una pratica routinaria [20]. Diversi studi hanno messo in evidenza la relazione esistente tra il peso di quest'organo e del nascituro [104-107]. In particolare la relazione tra il peso della placenta e il peso del neonato sono state particolarmente studiate e si è visto che alterazioni placentari, osservabili macroscopicamente, come ad esempio un aumento dello spessore della superficie villosa, è noto essere un fattore predittivo del peso alla nascita in umana. Difatti il peso placentare è responsabile del 36,6% delle variazioni del peso corporeo secondo Salafia et al [105] e del 39% per Roland et al [107]. Inoltre, la valutazione del peso della placenta, sembra influenzare problemi legati ad alterazioni della durante della gestazione ed essere coinvolto nel ritardo di crescita fetale [104, 105, 107, 108]. Altri studi invece lo vedono coinvolto nello sviluppo di patologie perinatali nonché nella predisposizione del neonato a sviluppare patologie cardiovascolari o ipertensione in età adulta [109]. In fine la valutazione del rapporto peso placenta e peso del neonato sembra fornire una buona indicazione di funzionalità placentare [106, 110].

In medicina veterinaria l'esame della placenta è diventata pratica comune nelle procedure ostetriche nella cavalla dove si è visto che la percentuale di puledri malati è maggiore quando si osservano anomalie placentari [21-24]. Ad oggi, molti studi sono centrati sulla valutazione della relazione esistente tra il peso della placenta e del neonato sia nella cavalla [22] ma anche nel suino [25] e bovino [26].

Nella specie canina solo negli ultimi anni sono stati condotti studi che mettessero in relazione caratteristiche macroscopiche e microscopiche con la cucciolata.

Nel 2016 è stato presentato un lavoro preliminare al XIX Congresso EVSSAR a Parigi [111] che ha evidenziato una relazione tra il peso della placenta e il peso alla nascita del neonato. Osservano che, all'interno della loro popolazione di studio costituita da 24 neonati di differente taglia e razza, per ogni aumento pari ad 1 grammo di peso placentare corrisponde un incremento pari al 6,77g di peso nel nascituro.

Nel 2019 al primo symposium ECAR a Vienna [112] sono stati presentati i risultati preliminari di questa tesi di dottorato dove è stata valutata una possibile relazione tra la glicemia misurata alla nascita prima dell'assunzione di colostro e l'APGAR score in 64 neonati nati mediante taglio cesareo dove si è evidenziato una differenza statisticamente significativa tra cuccioli con bassa glicemia alla nascita e il rapporto del peso della parte zonata della placenta e il peso del neonato. Questo a supporto dell'ipotesi del lavoro che la glicemia alla nascita potesse essere influenzata dalla funzionalità della placenta.

Il gruppo di Pisa, rispettivamente nel 2020 e 2021 ha pubblicato due lavori dove sono andati a studiare le placente di 72 cuccioli di razza toy e piccola [59, 62]. Nel primo studio hanno confrontato caratteristiche macroscopiche della placenta e il peso dei neonati, ed è emerso che il peso dei neonati era correlato positivamente con il peso della placenta, dalla sua area e dall'area vascolare della stessa così come già osservato in umana[59]. Nel secondo invece, hanno descritto gli aspetti istologico normali della placenta, in quanto appartenenti a cuccioli sani. Da questo studio è emerso che nel 75,4% delle placente analizzate erano presenti delle anomalie placentari sia macroscopiche, quali aree di necrosi e congestione, che microscopiche, quali aree di necrosi, mineralizzazione, congestione e infiltrazione neutrofilica. Inoltre hanno stabilito che il peso dei cuccioli alla nascita non è risultato influenzato in alcuna maniera dalla presenza di queste alterazioni istologiche. Pertanto concludono che alterazioni macro e microscopiche placentari sono normali da osservare in corso di parto e non influenzano il peso del nascituro [62].

Sempre nel 2021 è stato pubblicato un lavoro dal gruppo di studio di Bologna [113] che metteva in relazione alterazioni istologiche della placenta con l'out-come negativo dei neonati. Lo studio è stato condotto su 51 neonati di diversa taglia da cui è emerso che tra

tutte le lesioni istologiche osservate solo quella relative alla necrosi multifocale è associabile ad un maggior rischio di morte nei primi 7 giorni di vita. Lavoro riportato in allegato 3.

Pertanto il ruolo della placenta nella specie canina, come si può vedere, è ancora ignoto ed ulteriori studi sono necessari.

PARTE SPERIMENTALE

Obiettivi

Lo scopo principale di questo studio è quello di valutare se alcuni parametri clinici (indice APGAR e peso del neonato alla nascita) ed ematologici (glicemia e lattatemia) possano essere influenzati da aspetti macroscopici (peso dell'intera placenta, peso, area e volume della parte zonata) e microscopici della placenta. Inoltre vista la grande differenza morfologica e di pesi presenti all'interno della specie canina il lavoro prevede l'individuazione di un range di riferimento che, indipendente dalla taglia e/o razza d'appartenenza, permetta di stabilire il normale il peso di un neonato alla nascita e il normale peso che la placenta considerata in toto (ovvero parte zonata, cordone ombelicale e membrane fetali) e la sola parte zonata dovrebbero avere.

Materiali e Metodi

1. Selezione della popolazione

Lo studio è stato condotto su dati ottenuti da un totale da 163 neonati di differente razza e taglia, nati da 39 parti cesarei, di cui 22 programmati e 17 d'urgenza, eseguiti dall'Unità di Riproduzione del Servizio Clinico dei Piccoli Animali (SERCLIPA) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) di Bologna nel periodo compreso tra Giugno 2017 e Dicembre 2020. Ogni dato raccolto in corso di intervento di taglio cesareo è stato riportato su opportune cartelle cartacee (Allegato 2 e 3).

Di ogni cagna sono stati raccolti i seguenti dati anamnestici: razza, età, peso, durata della gravidanza (calcolata dal picco del LH o se non noto dall'ultimo accoppiamento), data presunta del parto, numero di gravidanze, problemi durante la gravidanza in atto o nelle precedenti, monitoraggio della gravidanza e stato sanitario (vaccinazioni e trattamenti antiparassitari) (figura 12).

CAGNA/GATTA _____ DATA ___/___/20__

Razza _____	Età _____	Peso _____ kg
Proprietario _____		
Gravidanza n. _____ Durata: _____ gg		
NOTE _____		

Antiparassitari: S/N _____ data _____		
Vaccinazioni: S/N _____ data _____		
Alimentazione _____		
Problemi durante precedenti gravidanze: S/N _____		

Problemi durante questa gravidanza: S/N _____		

Monitoraggio della gravidanza: S/N _____		

FIGURA 12: SCHEDE ANAMNESTICA CAGNA.

La programmazione dei tagli cesarei è avvenuta in base alla data di ovulazione e picco del LH, alle misurazioni fetometriche, quali diametro interno della camera gestazionale e diametro bi-parietale acquisite in corso dei controlli di gravidanza, e valutazione del progesterone sierico negli ultimi 7-10 giorni di gestazione [114-116]. Quarantotto ore prima della data presunta del parto è stata eseguita un'unica somministrazione di aglepristone a 10

mg/Kg sottocute a livello del piatto interno della coscia con lo scopo di preparare il feto al parto [117]. Ventiquattro ore prima della data presunta del parto si è proceduto con l'intervento di cesareo programmato.

Per quanto riguarda il tagli cesarei d'urgenza, la decisione di intervenire chirurgicamente è stata legata alla presenza di un parto iniziato distocico.

Tutte le cagne sottoposte a taglio cesareo programmato sono state sottoposte circa 3-4 giorni prima dell'intervento a visita clinica e anestesiologicala, in tale occasione sono stati eseguito esami emato-biochimici preoperatori risultati essere tutti nei limiti della norma.

Indifferente dal tipo di taglio cesareo, prima dell'intervento ogni cagna è stata sottoposta a visita clinica generale e valutazione ecografia al fine di stabilire vitalità dei feti.

Tutte le cagne sono state sottoposte al medesimo protocollo anestesiologicalo utilizzato dal Servizio di Anestesia e Rianimazione (SANE) del DIMEVET: induzione mediante l'utilizzo di Propofol o Alfaxalon e mantenimento in Isoflurano. Durante l'intervento le cagne sono state sottoposte a fluidoterapia con Ringer lattato (10 ml/kg/h). A fine intervento è stata somministrata sottocute ossitocina ad un dosaggio compreso tra 2-6 UI a seconda della taglia, ed è stata eseguita la terapia antibiotica con amoxicillina triidrato (15 mg/kg SC SID), continuata a casa dal proprietario con amoxicillina + acido clavulanico (12,5 mg/kg per OS BID) per un totale di cinque giorni di terapia.

Tutti gli interventi di taglio cesareo sono stati eseguiti dall'equipe dell'Unità di Riproduzione del SERCLIPA del DIMEVET. L'intervento si è svolto mediante accesso celiotomico che ha permesso l'esteriorizzazione dell'utero gravido. I feti sono stati estratti attraverso un'unica incisione eseguita a tutto spessore a carico della parete dell'utero, tra il corpo e una delle due corna uterine. Una volta estratti tutti i feti e le relative placente si è eseguita una sutura continua introflettente a due piani, oppure, qualora richiesto dal proprietario, o se necessario ai fini clinici del paziente (ad esempio in caso di mancata involuzione uterina o eccessivo sanguinamento dei siti di attacco placentare), si è proceduto con ovarioisterectomia come da routine.

2. La gestione del neonato e rilevamento sui dei parametri

Le attrezzature e i farmaci necessari per la rianimazione del neonato vengono preparati prima dell'inizio dell'intervento chirurgico. L'Equipe della rianimazione è costituita da personale addestrato appartenente all'Unità di Riproduzione del SERCLIPA, ed idealmente è costituita da un assistente per neonato.

I neonati, una volta estratti, liberati dagli involucri fetali e con il cordone ombelicale clampato vengono passati dal chirurgo all'equipe della rianimazione che procede con la rianimazione, che prevede la stimolazione del soggetto per attivare l'attività respiratoria e cardiocircolatoria, e ove necessario l'utilizzo di farmaci o tecniche dell'agopuntura per mezzo della stimolazione del punto GV26 di Jen Chung. Appena conclusa la rianimazione, ovvero il neonato respira, si muove e vocalizza si procede con la legatura del cordone ombelicale e sua disinfezione mediante betadine diluito in acqua, il neonato viene poi identificato mediante un numero identificativo corrispondente all'ordine di estrazione segnato su un cerotto di carta applicato sulla schiena e viene collocato nella termoculla opportunamente riscaldata a 29-31°C e umidità del 55-60% (figura 13).



FIGURA 13: TERMOCULLA, ALL'INTERNO È PRESENTE UN TERMOSTATO DIGITALE CHE SEGNA LA TEMPERATURA E UMIDITÀ AMBIENTALE. IN QUESTO PRECISO CASO LA TEMPERATURA SEGNATA È DI 26°C INFERIORE A QUELLA NORMALMENTE RICHIESTA MA LA FOTO È STATA PRESA POCO DOPO L'ESECUZIONE DI MANUALITÀ CHE HANNO CAUSATO L'ABBASSAMENTO LA TEMPERATURA INTERNA.

Finita la rianimazione ogni assistente si occupa di annotare sulla scheda di nascita (Allegato 3) i dati clinici del neonato a cui ha prestato assistenza, quali sesso, punteggio APGAR valutato entro i primi 5 minuti di vita, peso, temperatura, glicemia e lattati alla nascita. Nella

cartella vengono inoltre riportati i dati inerenti alla nascita: se nato vivo o morto o entro quante ore è morto dalla nascita e il tipo di parto eseguito (figura 14).

CUCCIULO/GATTINO N. _____			
nato vivo <input type="checkbox"/>	vitale a 2h <input type="checkbox"/>	vitale a 24h <input type="checkbox"/>	
nato morto <input type="checkbox"/>	morto entro 2h <input type="checkbox"/>	morto tra le 2 e le 24h <input type="checkbox"/>	
parto spontaneo <input type="checkbox"/>	parto assistito <input type="checkbox"/>	cesareo programmato. <input type="checkbox"/>	cesareo d'urgenza <input type="checkbox"/>
comparsa membrane fetali: h _____		nascita: h _____	
Apgar Score ENTRO 5 minuti:			
Mucose 0 1 2	Freq. cardiaca <180	180-220	>220
Resp. non piange/<6	piange piano/6-15	piange forte/>15	
Risposta allo stimolo 0 1 2	Motilità 0 1 2		TOT _____
sesto: ♀ ♂	temperatura °C: _____	peso: _____ g(_____% peso madre)	
placenta: peso g _____ (_____% peso cucciolo)	riflesso di suzione: h _____		
ricerca mammella: h _____	I poppata: h _____	esp. meconio: h _____	I minzione: h _____

FIGURA 14: SCHEDA RACCOLTA DATI NEONATO

2.1 Valutazione Apgar

Entro i primi 5 minuti della nascita ogni operatore procede con la valutazione dell'APGAR score che prevede l'assegnazione di un punteggio da 0 a 2 di cinque parametri: colore delle mucose, frequenza cardiaca, reattività, motilità e frequenza respiratoria.

Per la determinazione del punteggio APGAR si è deciso di utilizzare il sistema APGAR modificato messo a punto da Veronesi et al [12] e il sistema APGAR modificato per le razze brachicefaliche (bulldog francese ed inglese) di Batista et al [42].

2.2 Valutazione Peso

Una volta stabilizzato il neonato si è proceduto con la valutazione del peso corporeo (BW) mediante l'utilizzo di una bilancia elettronica graduata in grammi (portata max $2 \pm 0.0001\text{kg}$) così come illustrato in figura 15.



FIGURA 15: MISURAZIONE DEL PESO DEL NEONATO ALLA NASCITA MEDIANTE L'UTILIZZO DI UNA BILANCIA ELETTRONICA DA CUCINA GRADUATA IN GRAMMI.

2.3 Valutazione Glicemia e Lattatemia

A fine rianimazione sono state valutate la lattatemia e la glicemia (prima dell'assunzione di colostro) mediante l'impiego di analizzatori portatili con strisce reattive ad inserimento manuale validati per la specie canina (rispettivamente Lactate-Scout Analyzer e AlfaTrack) (figura 16). A tale fine è stata utilizzata una goccia di sangue ottenuta pungendo il cuscinetto plantare del neonato con un ago sterile da 22 o 24 G (figura 17 e 18).



FIGURA 16: MISURAZIONE DELLA LATTATEMIA E GLICEMIA NEL NEONATO MEDIANTE L'IMPIEGO DI ANALIZZATORI PORTATILI CON STRISCE REATTIVE. A SINISTRA LACCATE-SCOUT ANALYZER E LE RELATIVE STRISCE REATTIVE PER LA MISURAZIONE DELLA LATTATEMIA, A DESTRA ALFATRACK CON LE RELATIVE STRISCE REATTIVE



FIGURA 17: MISURAZIONE DELLA GLICEMIA IN UN NEONATO DI CAVALIER KING CHARLES



FIGURA 18: MISURAZIONE DEI LATTATI IN UN NEONATO DI BULLDOG FRANCESE

3. La valutazione della placenta

La placenta di ogni neonato è stata opportunamente identificata con il numero corrispondente al neonato stesso. A seguito della rimozione dei liquidi placentari è stata riposta su un foglio di carta assorbente per 5 minuti prima di procedere con la raccolta dei dati morfometrici, quali peso, dimensione e volume. A seguito della valutazione macroscopica l'intera placenta è stata conservata in contenitori ermetici per campioni patologici con formalina al 10% neutra tamponata, identificati con nome cognome del proprietario, data del cesareo e numero identificativo e consegnata al Servizio di Anatomia Patologica del DIMEVET per la valutazione microscopica.

3.1 Parte macroscopica:

La valutazione macroscopica della placenta ha previsto una valutazione della sua integrità e la raccolta dei dati morfometrici.

Attraverso l'utilizzo di una bilancia elettronica da cucina graduata in grammi (portata max 2 ± 0.0001 Kg) si è provveduto alla misurazione del peso totale della placenta (PLW) e a seguito della rimozione degli involucri fetali e del cordone ombelicale della sola parte zonata (ZPLW).

Le dimensioni della placenta (lunghezza, larghezza) sono state prese mediante un righello in acciaio graduato in centimetri (50 ± 0.1 cm) dopo averla tagliata trasversalmente e ben stesa su di una superficie piana (figura 19 e 20). La misura della larghezza è comprensiva anche dell'ematoma marginale. Il valore utilizzato per ognuno dei tre parametri deriva dalla media di tre misurazioni. Tali valori sono stati utilizzati per calcolare l'area della parte zonata (PLA) seguendo la formula per il calcolo geometrico dell'area del rettangolo (base x altezza).

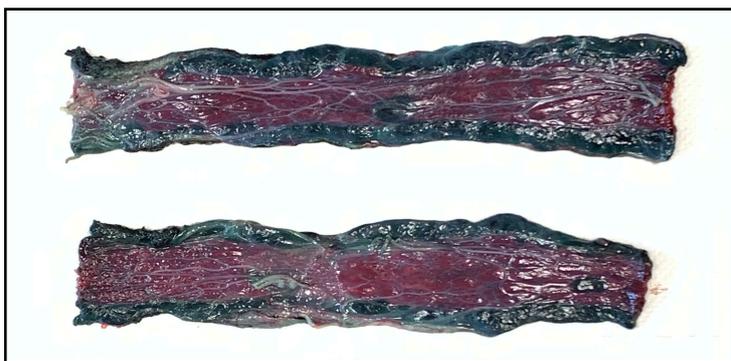


FIGURA 19: SUPERFICIE FETALE DELLA PARTE ZONATA ED EMATOMA MARGINALE DELLA PLACENTA PRIVATA DAGLI INVOGLI FETALI

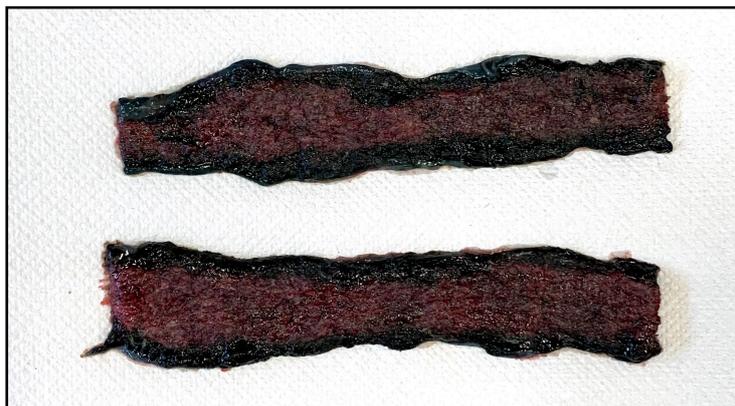


FIGURA 20: SUPERFICIE MATERNA DELLA PARTE ZONATA ED EMATOMA MARGINALE DELLA PLACENTA PRIVATA DEGLI INVOGLI FETALI

Il volume di 62/163 placenti è stato inoltre misurato mediante l'utilizzo di un baker di vetro graduato da laboratorio (500 ml \pm 0.1 ml) all'interno del quale è stata messa un volume di acqua distillata nota ed immersa la placenta (figura 21). Il volume della placenta corrisponde alla differenza tra i due volumi d'acqua.



FIGURA 21: MISURAZIONE DEL VOLUME DELLA PLACENTA MEDIANTE L'UTILIZZO DI UN BAKER DI VETRO GRADUATO DA LABORATORIO

3.2 Parte microscopica:

Le placente, tolte dalla formalina, sono state sezionate mediante l'utilizzo di un bisturi al fine di ottenere delle sezioni rappresentative. I campioni così ottenuti sono stati allocati in apposite gabbiette di plastica per istologia che hanno lo scopo di contenere il campione istologico nel corso delle fasi successive della preparazione, che lo portano fino all'inclusione in paraffina. Dai blocchetti di tessuto così ottenuti mediante microtomo sono state ottenute sezioni di 4 micron di spessore. Le sezioni sono state sparaffinate, idratate, e successivamente processate come da routine per l'istologia mediante colorazione Ematossilina-Eosina.

4. Analisi dei dati

Tutti dati anamnestici relativi alla madre, il tipo di taglio cesareo eseguito, i dati clinici e ematici del neonato e le valutazioni macro- e microscopiche della placenta sono stati riportati in una tabella Excel riassuntiva e hanno permesso di calcolare i seguenti indici di rapporto:

- Rapporto peso neonato / peso madre (BW/MBW);
- Rapporto peso totale placenta / peso neonato (PLW/BW);
- Rapporto peso della parte zonata / peso neonato (ZPLW/BW);
- Rapporto dell'area della parte zonata / peso del neonato (PLA/BW);
- Rapporto volume della parte zonata / peso del neonato (VOL/BW).

Con i dati ottenuti sono stati eseguiti 10 studi statistici

STUDIO STATISTICO 1:

Determinazione di un range di valore per il quale:

- il peso del neonato possa essere considerato normale alla nascita;
- il peso della placenta in toto (parte zonata, membrane fetali e cordone ombelico) possa essere considerata normale;
- il peso della sola parte zonata possa essere considerata normale.

STUDIO STATISTICO 2:

In funzione dell'APGAR score si esegue una prima analisi dividendo i neonati in due gruppi:

- Gruppo 1: cuccioli non critici, APGAR score >7 ;
- Gruppo 2: cuccioli critici, APGAR score < 7 .

Successivamente si procede confrontando i valori della glicemia, lattatemia, BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW tra i due gruppi.

STUDIO STATISTICO 3:

Si dividono i neonati in tre gruppi in funzione dell'APGAR score, con lo scopo di rendere più sensibile la lettura dei dati:

- Gruppo 1: cuccioli non critici, APGAR score > 7 ;
- Gruppo 2: cuccioli mediamente critici, APGAR score compreso 4-6;
- Gruppo 3: cuccioli critici, APGAR score < 3 .

Successivamente si procede confrontando valori della glicemia, lattatemia, BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW tra i tre gruppi.

STUDIO STATISTICO 4:

In funzione delle lesioni istologiche riscontrate a livello placentare si dividono i neonati in tre gruppi:

- Gruppo 0: necrosi assente;
- Gruppo 1: presenza di necrosi focale;
- Gruppo 2: presenza di necrosi multifocale.

Per poi procedere confrontando all'interno dei tre gruppi i valori dell'APGAR score, glicemia, lattatemia, BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW.

STUDIO STATISTICO 5:

Visto il valore di cut-off per i lattati stabilito dallo studio condotto da Groppetti et al. [13], si divide la popolazione dello studio in due gruppi nel seguente modo:

- Gruppo 1: cuccioli non critici, lattati > 5 mmol/L;
- Gruppo 2: cuccioli critici, lattati < 5 mmol/L.

Si procede confrontando i valori tra i due gruppi dell'APGAR score, glicemia, BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW.

Attraverso lo studio statistico 2 si individua il valore massimo della lattatemia presente nei neonati definiti non critici in funzione dell'APGAR score. In base a tale valore si dividono i neonati in due gruppi e si ripete il confronto dei parametri come sopra descritto:

- Gruppo 1: cuccioli non critici, lattati $> 6,7$ mmol/L;
- Gruppo 2: cuccioli critici, lattati $< 6,7$ mmol/L.

STUDIO STATISTICO 6:

Su un numero ridotto di campioni si ripete lo studio statistico 2 aggiungendo tra i parametri considerati il volume della parte zonata.

STUDIO STATISTICO 7:

Su un numero ridotto di campioni si ripete lo studio statistico 2 aggiungendo tra i parametri considerati il volume della parte zonata.

STUDIO STATISTICO 8:

Dei 123 neonati considerati nei precedenti studi, si considerano solo i neonati appartenenti alla taglia media, per un totale di 71 cuccioli. Si dividono in base all'indice APGAR in due gruppi così come descritto per nello studio statistico 2 e si procede ad eseguire la medesima analisi.

STUDIO STATISTICO 9:

Quanto descritto per lo studio statistico 7 si ripete su un campione costituito dai soli neonati appartenenti alla grande taglia (37/123 neonati).

STUDIO STATISTICO 10:

In base al risultato ottenuto nello studio statistico 1 la popolazione di 123 cuccioli viene divisa in 3 gruppi in funzione del BW/MBW :

- Gruppo 1: cuccioli normopeso, BW/MBW 0,9-2,74%;
- Gruppo 2: cuccioli sottopeso, BW/MBW < 0,9%;
- Gruppo 3: cuccioli sovrappeso, BW/MBW > 2,74%.

Successivamente si procede con il confronto dei parametri, quali indice APGAR, glicemia, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW, tra i tre gruppi.

5. Analisi Statistica

Per l'analisi statistica e la creazione dei grafici è stato utilizzato il software per la statistica IBM® SPSS® Statistics versione 28.0.0.0.

I dati nella statistica sono stati espressi come media \pm deviazione standard (sd), mediana e range interquantile (IQR) e *range*.

Tutti i dati raccolti sono stati testati per la normalità mediante il test statistico di Shapiro-Wilk. Il confronto tra i diversi gruppi è stato effettuato utilizzando i test non parametrici di Mann-Whitney (anche noto come test U di Mann-Whitney) e di Kruskal-Wallis, in quanto i dati sono risultati avere tutti una distribuzione non normale.

Con il fine di valutare una possibile dipendenza tra i parametri di riferimento in base ai quali si è divisa la popolazione di studio e le diverse variabili si è applicato il test dell'indice di correlazione di Pearson per le variabili numeriche e il test del Chi-Quadrato per le variabili qualitative.

I risultati sono stati ritenuti statisticamente significativi per $P < 0,05$.

Risultati

1. Studio di popolazione

Durante il periodo di studio sono stati raccolte le placente e i dati relativi a 163 neonati di cane di differente taglia e razza, provenienti da un totale di 39 tagli cesarei di cui 22 programmati e 17 d'urgenza.

Nello studio sono stati inclusi un totale di 23 razze: 4 American Bully, 1 Bassethound, 1 Boston Terrier, 2 Bovari del Bernese, 1 Boxer, 2 Bull Terrier, 1 Bull Terrier Miniature, 11 Bouledogue Francesi, 1 Bulldog Inglese, 1 Cavalier King Charles, 2 Chihuahua, 1 Corgie, 1 Golden Retriever, 1 Jack Russell, 2 Labrador, 1 Lagotto, 1 Parson Jack Russell, 1 Pastore Tedesco, 1 Pechinese, 1 Rodhesian, 1 Saluki e 1 meticcio. Di queste, in base allo standard di razza e al peso presentato prima della gravidanza, 7 appartenevano alla piccola taglia (peso fino a 10 kg), 21 alla media (peso >10-25 kg) e 11 alla grossa taglia (peso > 25kg).

Le cagne nel loro insieme presentavano un peso corporeo variabile tra 2,7 e 45 kg (peso medio \pm deviazione standard: 21,80 \pm 11,62 kg; mediana peso, IQR: 22kg, 18), un'età compresa tra 1 e 8,4 anni (età media \pm deviazione standard: 3,64 \pm 1,63 anni; mediana, IQR: età 3 anni, 1,5) e una parità compresa tra 1 e 4 parti (parità media \pm deviazione standard: 1,49 \pm 0,7; mediana parità, IQR: 1 parto, 1). I dati medi relativi all'età, peso e parità delle cagne raggruppati in base alla taglia di appartenenza al momento dell'intervento di taglio cesareo all'interno della popolazione sono riportati in tabella 1.

TABELLA 1: DISTRIBUZIONE DELL'ETÀ, PESO E PARITÀ A SECONDA DELLA TAGLIA (PICCOLA, MEDIA O GRANDE) ESPRESSA COME MEDIA \pm DEVIAZIONE STANDARD.

Taglia (numero soggetti)	Età [anni]	Peso [kg]	Parità
Piccola (7)	4,11 \pm 2,32	5,63 \pm 2,18	1,35 \pm 0,78
Media (21)	3,75 \pm 1,71	17,21 \pm 6,53	1,41 \pm 0,63
Grande (11)	3,31 \pm 1,09	34,92 \pm 6,24	1,66 \pm 0,77

Ogni cagna il giorno dell'intervento, indifferentemente dal tipo di taglio cesareo eseguito, è stata sottoposta a visita clinica completa e valutazione ecografia dei feti al fine di stabilire la presenza di sofferenza fetale o meno. Tutte le cagne al momento dell'intervento si presentavano sane, normoglicemiche e normolattemiche. Ventidue soggetti sono stati sottoposti a taglio cesareo programmato, mentre 17 a taglio cesareo d'urgenza.

I tagli cesari programmati sono stati eseguiti per necessità di razza (12/22), per la presenza di un feto solitario (8/22), per evitare un probabile rischio di distocia al momento del parto per dimensione troppo grande della cucciolata rispetto allo standard di razza [118] (2/22) o a causa dell'età della madre in quanto primipara e quindi più a rischio di distocia (3/22). Tutti i dati sono riportati in tabella 2.

TABELLA 2: DATI ANAMNESTICI RELATIVI ALLE CAGNE SOTTOPOSTE AD INTERVENTO DI TAGLIO CESAREO PROGRAMMATO.

Cagna	Razza	Età [anni]	Peso# [kg]	Parità	Dimensione cucciolata	Breed litter size [*]	Motivo	Patologie concomitanti
1	Chihuahua	1	3,6	1	5	L	Dimensione e cucciolata	
2	Bouledogue francese	2	13	2	1	S	Razza e Feto solitario	Ipoluteinismo
3	Bovaro del Bernese	4	43,5	2	1	S	Feto solitario	
4	Bouledogue francese	3	11,8	2	8	L	Razza	
5	Bouledogue francese	4	12,5	2	7	L	Razza	
6	Bulldog Inglese	2	32,5	1	10	L	Razza	
7	Chihuahua	5	2,7	1	2	S	Età madre primipara	
8	American Bully	3	24	1	6	N	Feto solitario	
9	Bouledogue francese	3	11,2	1	3	S	Razza	
10	American Bully	4	17,9	1	4	N	Razza	Prolasso Vaginale
11	Bouledogue francese	2	12	1	5	N	Razza	
12	Boston Terrier	7	5,6	1	2	S	Età madre primipara	
13	Bouledogue francese	4	11,3	1	3	S	Razza	Ipoluteinismo
14	Bull Terrier	5	24,6	2	1	S	Feto solitario	
15	Pechinese	6	4,7		1	S	Feto solitario	
16	Bouledogue francese	3	13,3	3	4	N	Razza	
17	Bull Terrier	5,5	27,7	1	7	L	Dimensione e cucciolata ed Età madre primipara	
18	Bouledogue francese	4	12,8	2	4	N	Feto solitario	Ipoluteinismo
19	Basset Hound	4	35	1	1	S	Feto solitario	
20	American Bully	4	27	2	6	N	Razza	
21	Saluki	7	24	2	1	S	Feto solitario	Ipoluteinismo
22	Bouledogue francese	1	10,5	1	2	S	Razza	

PESO MISURATO AL MOMENTO DEL PARTO

* LA DIMENSIONE DELLA CUCCIOLATA È STATA VALUTATA SECONDO BORGES ET AL, 2011 [118]

I 17 tagli cesarei d'urgenza sono stati eseguiti a causa di un parto languido (2/17), inerzia uterina primaria (7/17), ostruzione del canale del parto a seguito di una frattura pregressa del bacino (1/17), presenza di un setto vaginale (1/17) e una stenosi vaginale di natura ignota (1/17) o un mal posizionamento del feto (2/17), per distacco placentare, per la presenza di un feto solitario (1/17) ed infine per necessità di razza (3/17). I dati anamnestici delle cagne e motivo del cesareo sono riportati in tabella 3.

TABELLA 3: DATI ANAMNESTICI RELATIVI ALLE CAGNE SOTTOPOSTE AD INTERVENTO DI TAGLIO CESAREO D'URGENZA.

Cagna	Razza	Età [anni]	Peso# [Kg]	Parità	Dimensione e cucciolata	Breed litter size [*]	Motivo distocia
1	Bouledogue francese	5	16,8	1	6	L	Razza
2	Rhodesian	4	45	1	7	S	Inerzia uterina
3	Bouledogue francese	1,5	12	1	5	N	Razza
4	Corgie	6	14,8	4	1	S	Feto solitario
5	Lagotto	1,5	13	1	5	S	Ostruzione da mal posizionamento
6	Labrador	3	40,2	2	7	N	Ostruzione da stenosi vaginale
7	Labrador	6	35,5	2	9	L	Parto languido inerzia uterina secondaria
8	Parson Jack Russell	6	7,6	3	3	S	Inerzia uterina
9	meticcio	8,4	22	1	5	N	Frattura bacino pregressa
10	Bull Terrier Miniature	5	14	2	5	N	Inerzia uterina
11	Boxer	3	29,7	1	3	S	Parto languido
12	American Bully	3	30	1	8	N	Razza
13	Golden Retriever	5	30	3	3	S	Inerzia uterina
14	Cavalier King Charles	6	9,2	1	2	S	Inerzia uterina
15	Jack Russell	3	6,97	1	3	S	Ostruzione da mal posizionamento
16	Pastore Tedesco	4	28	3	9	L	Inerzia uterina (lieve ipocalcemia)
17	Bovaro del Bernese	2	39,7	1	7	N	Inerzia uterina

PESO MISURATO AL MOMENTO DEL PARTO

* LA DIMENSIONE DELLA CUCCIOLATA È STATA VALUTATA SECONDO BORGES ET AL, 2011 [118]

In base allo studio condotto da Borges et al. [118], le dimensioni delle cucciolate incluse nel nostro studio sono normali in funzione della taglia e razza solo in 10/39 cucciolate, piccole in 20/39 e grandi in 9/39. Analizzando questo dato in funzione della taglia del soggetto si

osserva che per cagne di grossa taglia 3/11 presentavano cucciolate di grandi dimensioni, 3/11 normali mentre 5/11 piccole. Per la taglia media invece 5/21 erano grandi, 7/21 normali e 9/21 piccole. Per la taglia piccola si osservano solo dimensioni di cucciolate grandi (1/7) o piccole (6/7). La distribuzione della dimensione della cucciolata in funzione della dimensione attesa secondo Borges et al. [118] nell'insieme della popolazione è riportato in figura 22, mentre in figura 23 è riportata la distribuzione all'interno delle taglie presenti nella popolazione in studio.

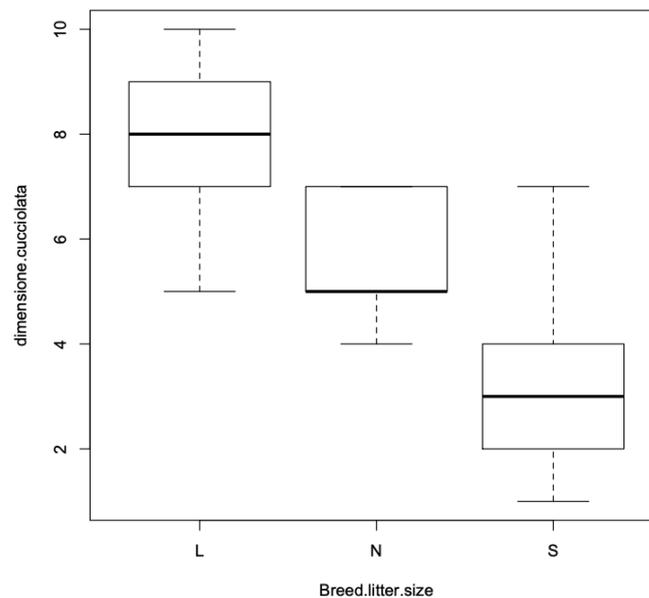


FIGURA 22: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELLA DISTRIBUZIONE DELLA DIMENSIONE DELLA CUCCIOLATA IN FUNZIONE DELLA DIMENSIONE ATTESA RISPETTO ALLA RAZZA E TAGLIA DEL CANE SECONDO LO STUDIO CONDOTTO DA BORGES ET AL. [118]. OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI

L - CUCCIOLATA DI GRANDE DIMENSIONE, N- CUCCIOLATA DI DIMENSIONI NORMALI, S- CUCCIOLATA DI PICCOLE DIMENSIONI

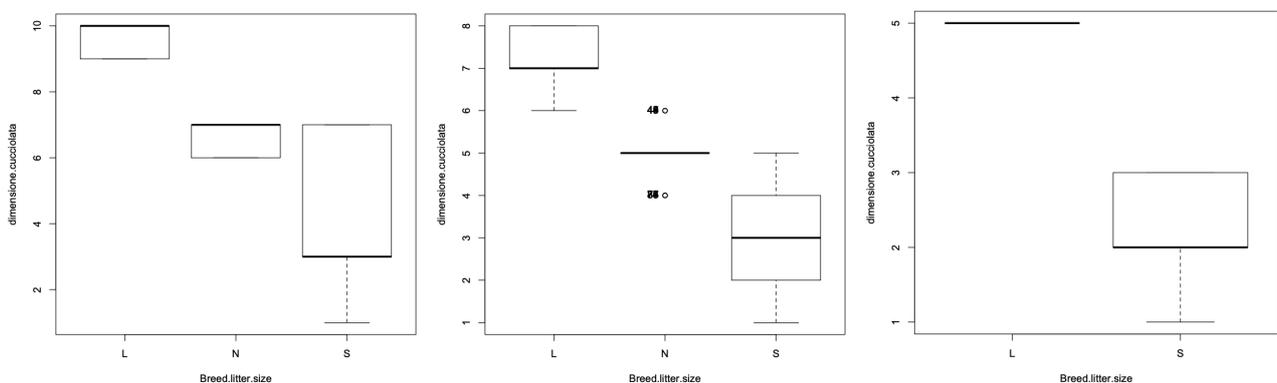


FIGURA 23: GRAFICI A SCATOLA E BAFFI DELLE DISTRIBUZIONI DELLA DIMENSIONE DELLA CUCCIOLATA IN FUNZIONE DELLA DIMENSIONE ATTESA RISPETTO ALLA RAZZA E TAGLIA DEL CANE SECONDO LO STUDIO CONDOTTO DA BORGES ET AL. [118] IN FUNZIONE DELLE TAGLIE DI CANE, PARTENDO DA SINISTRA: GRANDE TAGLIA, MEDIA TAGLIA, PICCOLA TAGLIA.

OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI

L - CUCCIOLATA DI GRANDE DIMENSIONE, N- CUCCIOLATA DI DIMENSIONI NORMALI, S- CUCCIOLATA DI PICCOLE DIMENSIONI

Il numero totale di cuccioli nati dai parti prese in esame in questo studio sono 172, di questi solo 163 neonati sono stati esaminati in quanto 9 sono nati mediante parto naturale non in struttura. Dei 163 neonati 18 (11,04%) appartengono alla piccola taglia, 89 (54,6%) alla media e 56 (34,36%) alla grande, i dati inerenti alla razza e taglia dei neonati sono riportati in tabella 4.

TABELLA 4: RAZZA DI NEONATI INCLUSI NELLO STUDIO.

Taglia^a	Razza	Cucciolate	Numero di cuccioli nati	Numero di cuccioli esaminati^b
Piccola (fino a 10 kg)	Boston Terrier Cavalier King Charles Chihuahua Jack Russell Parson Jack Russell Pechinese	7	18	18
Media (>10-25 Kg)	American Bully Bouledogue francese Bull Terrier Bull Terrier Miniature Corgie Lagotto Meticcio Saluki	21	89	89
Grande (> 25 Kg)	American Bully Basset Hound Bovaro del Bernese Boxer Bulldog Inglese Labrador Golden Retriever Pastore Tedesco Rhodesian	11	65	56
Totale		39	172	163

a- DEFINITO IN ACCORDO AL PESO RAGGIUNTO IN ETÀ ADULTA

b- SONO STATI ESCLUSI I CUCCIOLI NATI MORTI O SOTTOPOSTO AD EUTANASIA

76/163 neonati sono nati mediante taglio cesareo mentre 84/163 mediante taglio cesareo programmato. 75/163 neonati erano alloggiati nel corno destro mentre 77/163 nel corno sinistro e di 11/163 non è stato possibile determinarlo in quanto già incanalati oppure mal posizionati (a cavallo della biforcazione uterina), in fine 96/163 presentavano una presentazione anteriore (cefalici), 56/163 una presentazione podalica, mentre di 10/163 non è stato possibile rilevarla in quanto erano posizionati a cavallo della biforcazione uterina. Il

rapporto dei sessi dei neonati è 1,19 maschi (86/163 pari al 52,76%) a 0,8 femmine (72/163 pari al 44,17%), mentre per 5/163 neonati (il 3,07%) il sesso non è stato rilevato.

Il peso dei neonati nell'insieme oscillava tra i 65g e 659g, con una media pari a $330,88 \pm 119,40$ g (media \pm deviazione standard). Il peso medio per neonati appartenenti alla piccola taglia era pari a $177,38 \pm 45,06$ g (range 111 - 270 g), media taglia $299,47 \pm 45,06$ g (range 65 - 505 g) e grande taglia $432,64 \pm 104,56$ g (range 246 - 659 g) (figura 24).

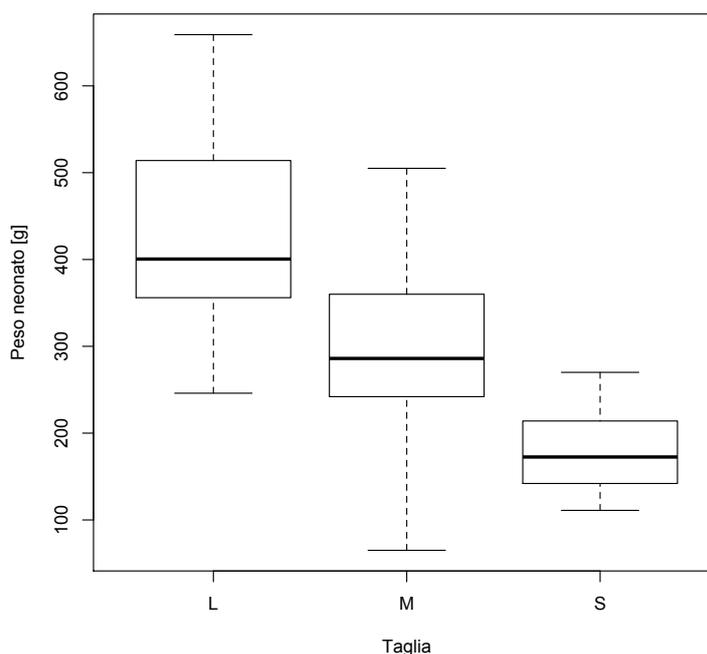


FIGURA 24: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEL PESO ALLA NASCITA DEI 163 NEONATI INCLUSI NELLO STUDIO DIVISI IN FUNZIONE DELLA TAGLIA (L: GRANDE, M: MEDIA, S: PICCOLA). OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Dei 163 neonati 29 presentavano dei difetti congeniti o problemi di sviluppo fetali quali: anasarca di diversa gravità (11/29) (figura 25), palatoschisi di diverso grado (9/29) (figura 26 e 27), deviazione di uno o entrambi gli arti posteriori (3/29), idrocefalo di lieve entità associato alla presenza di una fontanella di dimensione importante (4/29) (figura 28), prematurità (1/29) (figura 29), ritardo di crescita fetale (1/29) e un neonato presentava un intestino sovradisteso visualizzato ecograficamente sia in corso di gravidanza che nel post-partum (1/29) (figura 30).



FIGURA 25: NEONATO MASCHIO DI BOULEDOGUE FRANCESE CON ANASARCA



FIGURA 26: NEONATO MASCHIO DI BOULEDOGUE FRANCESE CON PALATOSCHISI COMPLETA E LABBRO LEPORINO

Di questi 29 neonati, di 10 i proprietari hanno richiesto l'eutanasia a causa della presenza di difetti congeniti non compatibili con la vita (anasarca, palatoschisi), 1 soggetto affetto da anasarca non ha risposto alla rianimazione (il proprietario era intenzionato a tentare con la terapia medica), 1 è morto a 2 ore dalla nascita (pechinese maschio con forti segni di prematurità, figura 29), 1 è stato mangiato dalla madre a 2 giorni d'età (femmina di pastore tedesco con alterazioni di natura d'accertarsi a carico dell'intestino, i proprietari non avevano acconsentito al ricovero preventivo), mentre 7 appartenenti alla stessa cucciolata sono deceduti tra i 3 e 15 giorni di vita a causa di un'infezione batterica da *Streptococcus zooepidemicus* contratta dalla madre.



FIGURA 27: NEONATO DI AMERICAN BULLY FEMMINA CON PALATOSCHISI, FONTANELLA APERTA E ALOPECICA LOCALE



FIGURA 28: NEONATO MASCHIO DI CHIHUAHUA CON FONTANELLA DI IMPORTANTI DIMENSIONI E CRANIO CON OSSA FRONTALI PROMINENTI COMPATIBILI CON IDROCEFALO



FIGURA 29: NEONATO DI PECHINESE MASCHIO CON SEGNI DI PREMATURITÀ CARATTERIZZATI DA REGIONE PERINATALE GLABRA, REGIONE DEL COLLO E ARTI ANTERIORI CON PRESENZA DI PELO RADO, ANO EMORRAGICO, ERANO INOLTRE PRESENTI PETECCHIE A LIVELLO DI ADDOME E LINGUA.

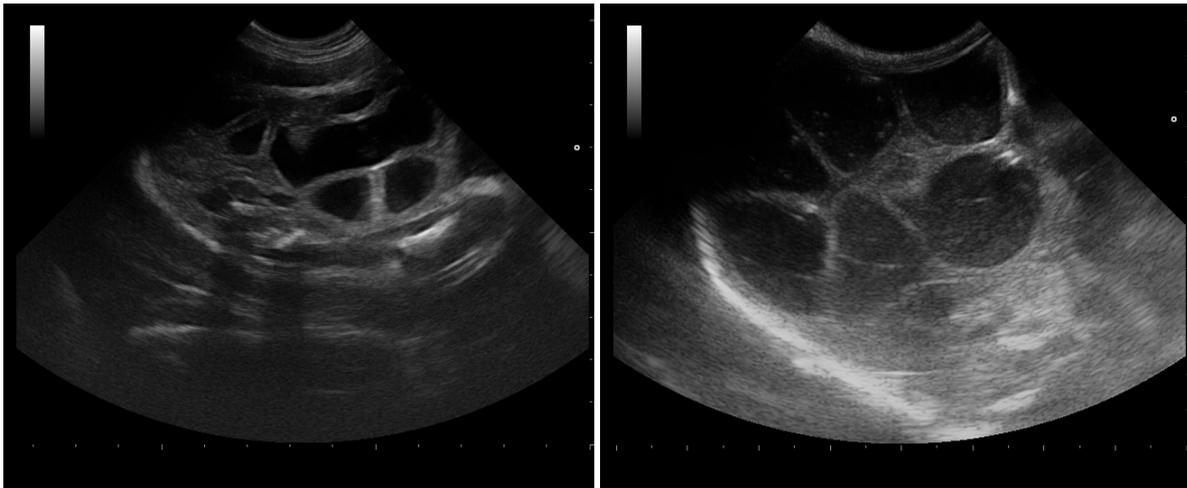


FIGURA 30: IMMAGINE ECOGRAFIA DELL'INTESTINO DEL NEONATO DI PASTORE TEDESCO, A DESTRA L'IMMAGINE ECOGRAFIA PRE- INTERVENTO A SINISTRA AD 1 GIORNO DI VITA.

Di questi ad oggi 9 sono tutt'ora vivi: un neonato di Bouledogue francese con palatoschisi è stato portato fino all'età dell'intervento ed operato al fine di ridurre il difetto (figura 31), un neonato di Bulldog inglese affetto da anasarca ha risposto correttamente alla terapia medica, un American Bully affetto da ritardo di crescita fetale con le dovute precauzioni e attenzioni prese ad oggi ha raggiunto la taglia prevista per la sua razza e non presenta problemi di salute di alcun tipo (figura 32), i 3 Bull Terrier che presentavano una deviazione a carico degli arti posteriori a seguito di manipolazioni ed esercizi di fisioterapia mirati gli si sono riposizionati gli arti nel corretto appiombamento, mentre la fontanella aperta di grandi dimensioni di due Chihuahua si è andata a ridurre con l'età e i due neonati non hanno mai presentato sintomi da idrocefalo, uno dei due presentava inoltre segni di pectus excavatum alla nascita risolti con manipolazioni a carico della cassa toracica [119].



FIGURA 31: NEONATO DI BOULEDOGUE FRANCESE CON PALATOSCHISI, NELL'IMMAGINE A DESTRA IL NEONATO VIENE ALLATTATO CON IL BIBERON SPECIALNEEDS DELLA MEDELA PROGETTATO PER I BAMBINI CHE NON RIESCONO A CREARE IL VUOTO A CAUSA DI SINDROMI E DISTURBI NEUROLOGICI, OPPURE PERCHÉ AFFETTI DA LABBRO LEPORINO/PALATOSCHISI.



FIGURA 32: NEONATO MASCHIO DI AMERICAN BULLY CON RITARDO DI CRESCITA FETALE. A SINISTRA A 3 GIORNI DI VITA, A DESTRA INSIEME AI FRATELLI A 69 GIORNI D'ETÀ. ALLA NASCITA PESAVA 275G CONTRO UNA MEDIA DI 470G DEI FRATELLI (RANGE 450-505G), PRESENTAVA INOLTRE PELO RADO A LIVELLO DI ESTREMITÀ DEGLI ARTI E MUSO COMPATIBILI CON UNA LIEVE PREMATURITÀ.

2. Analisi degli studi statistici

Al fine di eseguire l'analisi statistica necessaria per i 10 studi è stato necessario uniformare i dati, ovvero sono stati esclusi tutti quei neonati che presentavano solo una parte dei parametri necessari per l'analisi statistica del caso. In tabella 5 sono riportate le dimensioni delle popolazioni di studio per i singoli studi statistici un volta uniformati i dati.

TABELLA 5: DIMENSIONE DELLA POPOLAZIONE UTILIZZATA NEI 10 STUDI STATISTICI

Studio statistico	Dimensione popolazione
Studio statistico 1	150
Studio statistico 2	123
Studio statistico 3	123
Studio statistico 4	123
Studio statistico 5	123
Studio statistico 6	59
Studio statistico 7	59
Studio statistico 8	71
Studio statistico 9	37
Studio statistico 10	123

Nella specie canina esistono delle importanti differenze di taglia, e i cuccioli inclusi nello studio appartengono a differenti razze e taglie, pertanto si provveduto a normalizzare i dati relativi al peso del nascituro, al peso della placenta inclusi gli invogli fetali e il cordone ombelicale, al peso, all'area e volume della parte zonata, esprimendoli sotto forma di indici di rapporto, nel caso del peso del neonato il rapporto è stato calcolato in funzione del peso materno, mentre per i parametri macroscopici della placente si sono rapportati con il peso del neonato stesso. Di seguito ci si riferirà a questo indici di rapporto con le seguenti abbreviazioni:

- indice di rapporto peso neonato con il peso della madre: BW/MBW;
- indice di rapporto peso placenta in toto e peso del neonato: PLW/BW;
- indice di rapporto peso parte zonata e peso del neonato: ZPLW/BW;
- indice di rapporto area della parte zonata e peso del neonato: PLA/BW;

- indice di rapporto del volume della parte zonata e peso del neonato: VOL/BW.

Presentando tutti i dati una distribuzione non lineare per il test di Shapiro-Wilk si sono utilizzati i test statistici non parametrici di Mann-Whitney e di Kruskal-Wallis con livello di significatività pari a $p\text{-value} < 0,05$.

Le frequenze di distribuzione dei parametri analizzati quali glicemia, lattatemia e gli indici di rapporto BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW e PLA/BW all'interno della popolazione di studio dei studi statistici 2-3-4-5 sono rappresentate in figura 33, quelle dei studi statistici 6 e 7 nelle figure 34 e 35. Mentre nelle figure 36 e 37 sono riportate le frequenze di distribuzione dei parametri analizzati rispettivamente negli studi statistici 8 e 9.

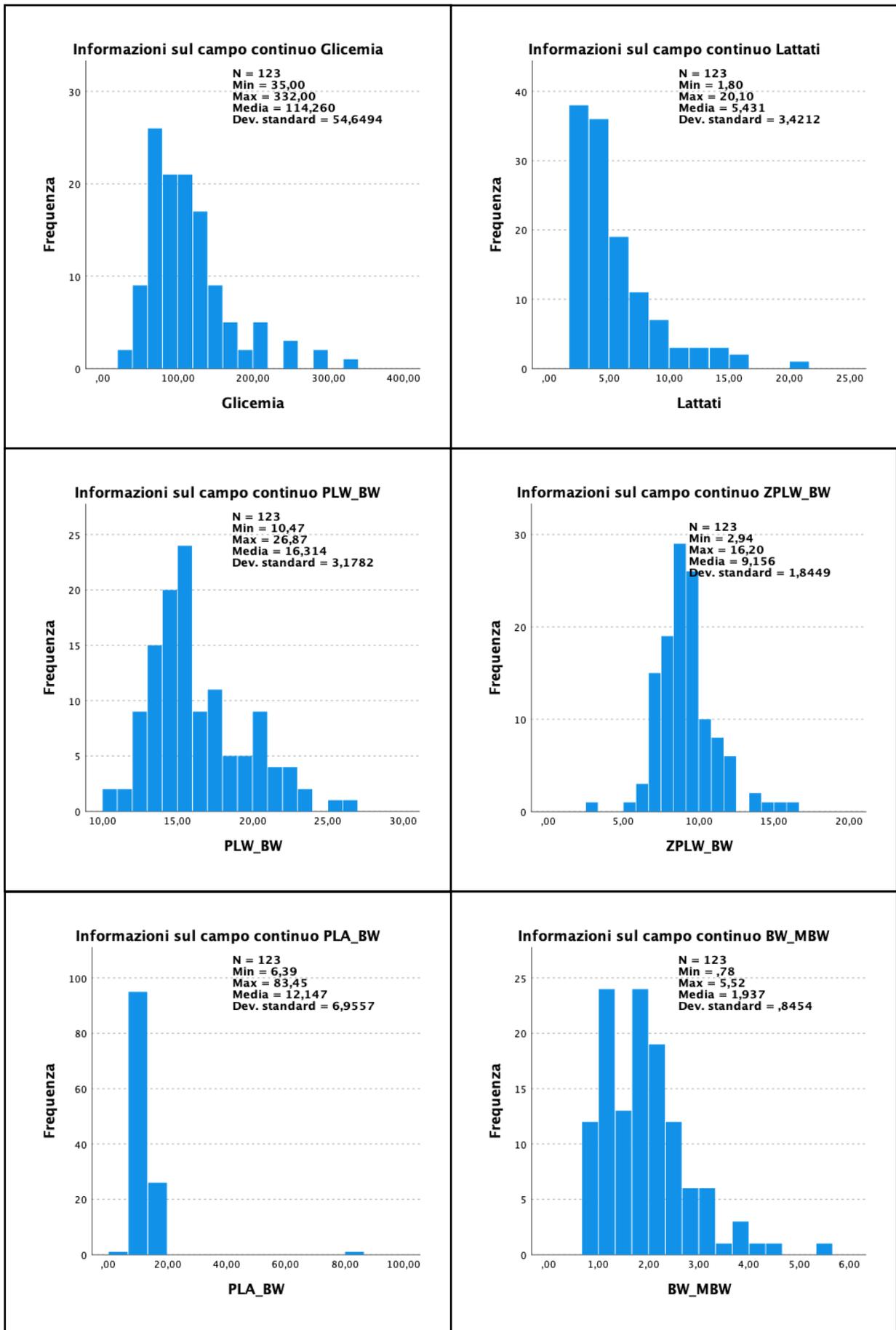


FIGURA 33: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELLA GLICEMIA, DEI LATTATI, E DEGLI INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW E PLA/BW NELLA POPOLAZIONE DI STUDIO COMPOSTA DA 123 SOGGETTI UTILIZZATA NEGLI STUDI STATISTICI 2-3-4-5

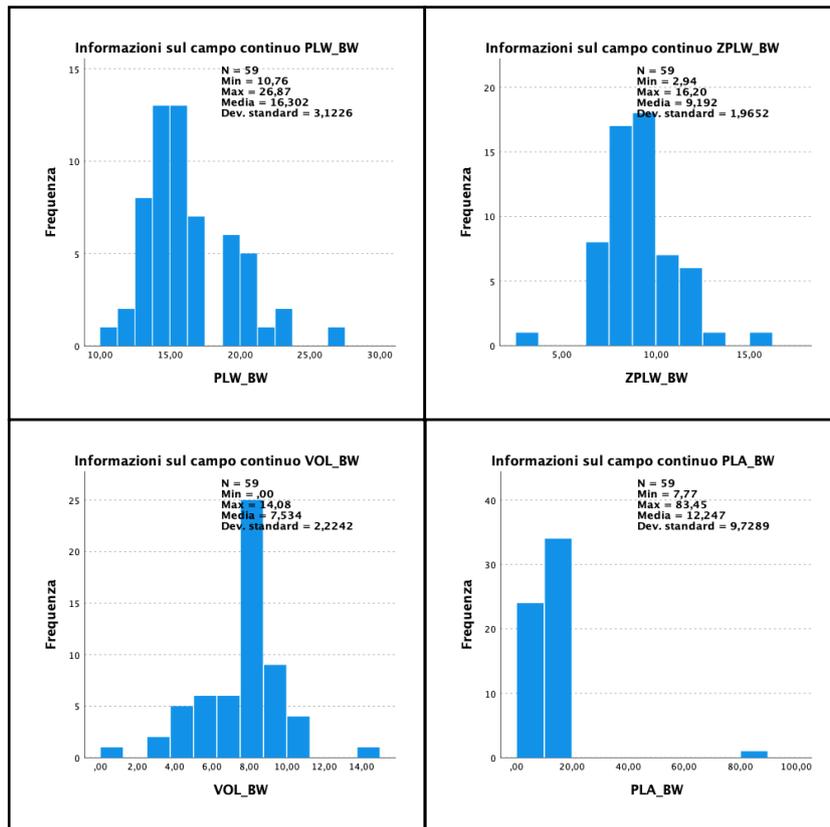


FIGURA 34: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DEI PARAMETRI AMATI (GLICEMIA E LATTATI) E CLINICI (INDICE APGAR E PESO DEL NEONATO ALLA NASCITA) NELLA POPOLAZIONE DI STUDIO COMPOSTA DA 59 SOGGETTI UTILIZZATA NEGLI STUDI STATISTICI 6 E 7

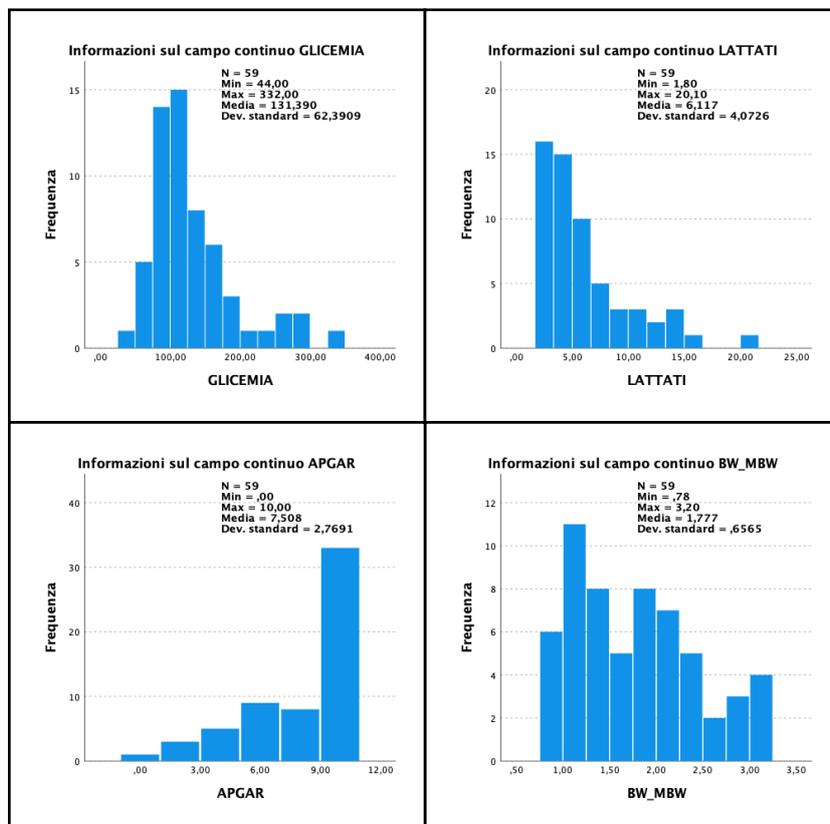


FIGURA 35: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DEI PARAMETRI MACROSCOPICI DELLA PLACENTA ESPRESI COME INDICI DI RAPPORTO CON IL PESO DEL NEONATO (PLW_BW: PESO DELLA PLACENTA, ZPLW_BW: PESO DELLA PARTE ZONATA, PLA_BW: AREA DELLA PARTE ZONATA, VOL_BW: VOLUME PARTE ZONATA) NELLA POPOLAZIONE DI STUDIO COMPOSTA DA 59 SOGGETTI UTILIZZATA NEGLI STUDI STATISTICI 6 E 7

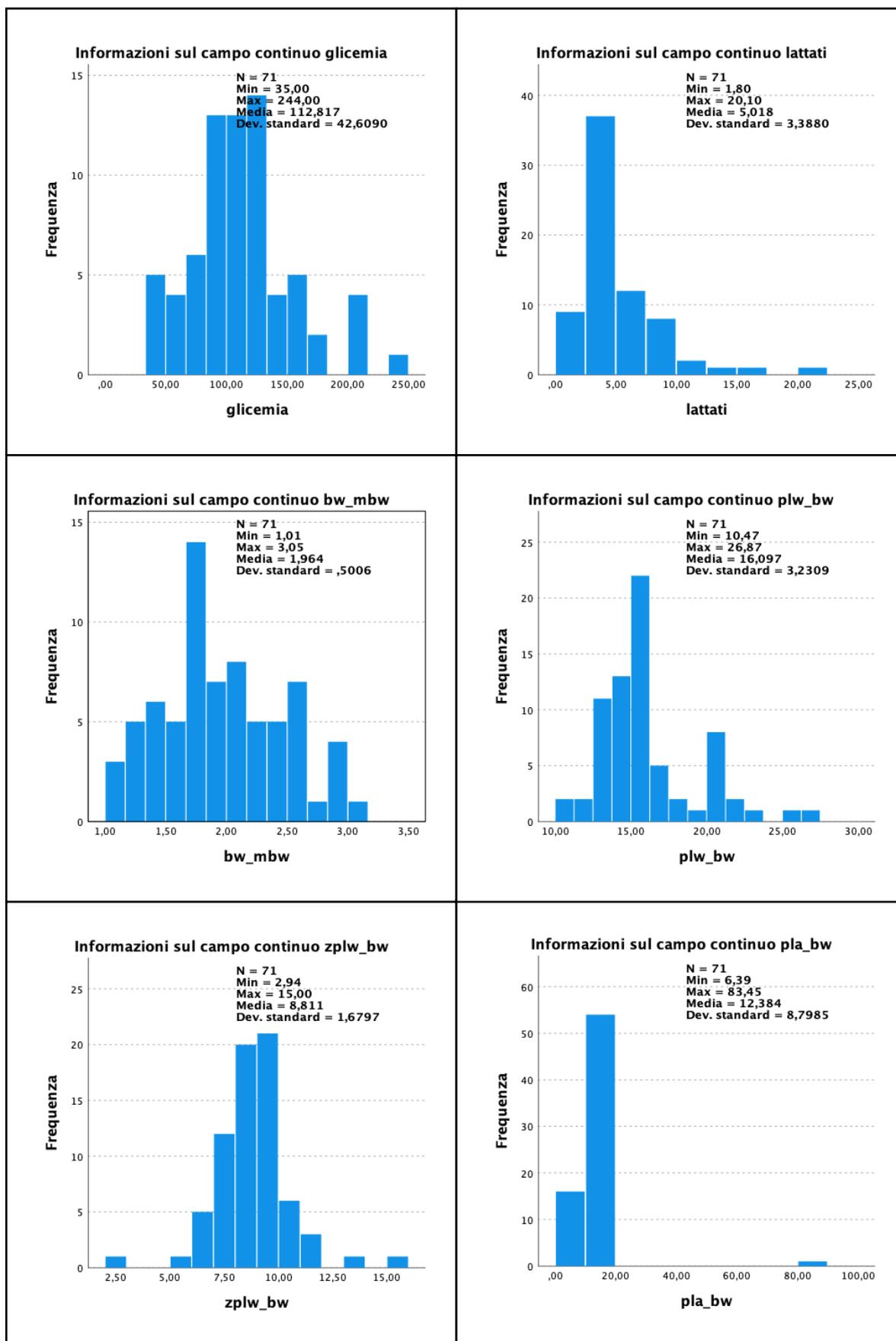


FIGURA 36: DISTRIBUZIONE DELLA GLICEMIA, LATTEMIA E DEGLI INDICI DI RAPPORTO DEL PESO DEL NEONATO IN FUNZIONE DEL PESO MATERNO (BW_MBW), DELLA PLACENTA IN TOTTO, DELLA SOLA PARTE ZONATA E DELL'AREA DELLA PARTE ZONATA IN FUNZIONE DEL PESO DEL NEONATO (PLW_BW, ZPLW_BW E PLA_BW) PER I CUCCIOLI APPARTENENTI ALLA TAGLIA MEDIA, UTILIZZATA NELLO STUDIO STATISTICO 8.

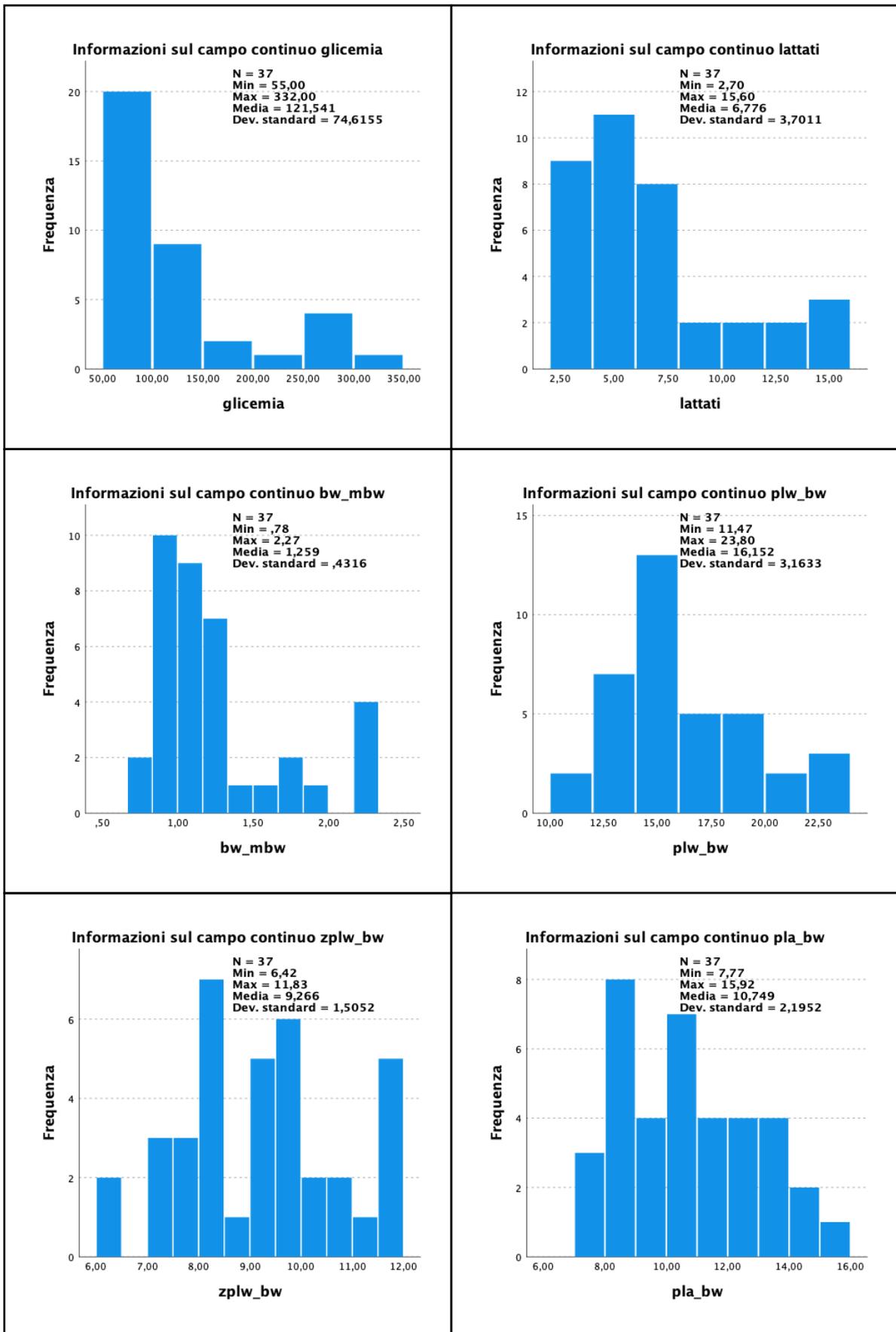


FIGURA 37: DISTRIBUZIONE DELLA GLICEMIA, LATTEMIA E DEGLI INDICI DI RAPPORTO DEL PESO DEL NEONATO IN FUNZIONE DEL PESO MATERNO (BW_MBW), DELLA PLACENTA IN TOTO, DELLA SOLA PARTE ZONATA E DELL'AREA DELLA PARTE ZONATA IN FUNZIONE DEL PESO DEL NEONATO (PLW_BW, ZPLW_BW E PLA_BW) PER I CUCCIOLI APPARTENENTI ALLA TAGLIA GRANDE, UTILIZZATA NELLO STUDIO STATISTICO

Studio statistico 1

Con questo studio statistico si è voluto individuare, indifferentemente dalla razza e taglia di appartenenza del neonato, un range di valore per il quale si possa definire normale il peso del neonato alla nascita e il relativo peso della placenta in toto (ovvero considerando la parte zonata e gli invogli) e della sola parte zonata esprimendoli come percentuale, il primo in funzione del peso materno, i secondi rispetto al peso del nascituro.

Il campione di studio è costituito da 150 neonati, divisi in 2 gruppi, critici e non critici, in funzione dell'indice APGAR valutato alla nascita:

- Gruppo 1: neonati non critici con punteggio APGAR ≥ 7 (totale 95 soggetti);
- Gruppo 2: neonati critici con punteggio APGAR ≤ 6 (totale 55 soggetti).

Il test statistico di Mann-Whitney ha dimostrato non esserci una differenza statisticamente significativa tra i gruppi in riferimento del BW/MBW, PLW/BW e ZPLW/BW, ciononostante al fine di stabilire la percentuale normale dei pesi preposta per questo studio si sono considerati solamente i neonati appartenenti al gruppo 1. Dallo studio è pertanto emerso che i valori per i quali, indifferentemente dalla taglia e razza, un neonato può considerarsi avere un peso normale e la placenta essere considerata normale sono i seguenti:

- il neonato deve presentare un peso alla nascita pari al 0,9 - 2,74 % del peso materno;
- la placenta in toto (dove si considera la parte zonata più tutte le membrane fetali e il cordone ombelicale) deve presentare un peso pari al 12,22 - 19,18% del peso del neonato alla nascita;
- la parte zonata deve presentare un peso pari al 7,26 - 11,24 % del peso del neonato alla nascita.

In tabella 6 sono riportati i valori espressi in forma di medie \pm deviazione standard, mediana (IQR) e range di riferimento dei rapporti di peso all'interno dei due gruppi.

TABELLA 6: MEDIE \pm DEVIAZIONE STANDARD, MEDIANA (IQR) E RANGE DELLE PERCENTUALI DEL PESO DEL NEONATO ALLA NASCITA IN FUNZIONE DEL PESO MATERNO (BW/MBW), DEL PESO DELL'INTERA PLACENTA IN FUNZIONE DEL PESO DEL NEONATO (PLW/BW) E DELLA SOLA PARTE ZONATA IN FUNZIONE DEL PESO DEL NEONATO (ZPLW/BW) ALL'INTERNO DEI GRUPPI DI APPARTENENZA.

	Gruppo	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
BW/MBW	Gruppo 1	1,85 \pm 0,71	1,82 (0,92)	0,78 - 4,59
	Gruppo 2	1,84 \pm 0,95	1,65 (1,09)	0,66 - 5,51
PLW/BW	Gruppo 1	16,45 \pm 3,15	15,70 (3,48)	10,46 - 26,86
	Gruppo 2	16,77 \pm 3,98	15,96 (5,01)	8,44 - 29,03
ZPLW/BW	Gruppo 1	9,20 \pm 1,78	9,25 (1,99)	2,94 - 15
	Gruppo 2	9,47 \pm 2,07	8,98 (1,79)	5,74 - 16,19

Studio statistico 2

In questo studio statistico si è valutata l'esistenza di una possibile relazione tra i parametri ematici (glicemia e lattatemia) e clinici (peso alla nascita) del neonato e parametri macroscopici della placenta con il valore dell'indice APGAR.

Pertanto, prendendo in riferimento l'indice APGAR come parametro per definire un neonato critico alla nascita, si è divisa la popolazione di studio, costituita da 123 neonati, in 2 gruppi:

- Gruppo 1: neonati non critici che presentano un APGAR score ≥ 7 ;
- Gruppo 2: neonati critici che presentano un APGAR score ≤ 6 .

Le dimensioni dei due gruppi risultano essere di 77 neonati per il Gruppo 1 e 46 per il Gruppo 2.

In tabella 7 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri all'interno dei due gruppi.

TABALLA 7: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici APGAR ≥ 7 Dimensione campione: 77	Glicemia [mg/dl]	115,63 \pm 58,58	103 (50)	35 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	5,14 \pm 3,54	3,9 (2,8)	1,80 - 16,5
	BW/MBW [%]	1,9 \pm 0,75	1,84 (0,96)	0,78 - 4,59
	PLW/BW [%]	16,25 \pm 3,2	15,51 (3,51)	10,47 - 26,87
	ZPLW/BW [%]	9,03 \pm 1,8	9,05 (1,80)	2,94 - 15
	PLA/BW [%]	11,19 \pm 2,29	10,88 (2,49)	6,39 - 17,38
Gruppo 2: neonati critici APGAR ≤ 6 Dimensione campione: 46	Glicemia [mg/dl]	111,95 \pm 48,7	98,5 (65,75)	50 - 244
	Lattatemia [mmol/L]	5,92 \pm 3,18	5,2 (3,75)	1,80 - 20,10
	BW/MBW [%]	1,98 \pm 0,98	1,71 (1,22)	0,91 - 5,52
	PLW/BW [%]	16,41 \pm 3,16	15,66 (3,51)	11,47 - 23,80
	ZPLW/BW [%]	9,36 \pm 1,93	8,98 (1,64)	6,42 - 16,20
	PLA/BW [%]	13,75 \pm 10,87	11,8 (3,9)	7,77 - 83,45

Al fine dell'analisi statistica si è utilizzato, visto la distribuzione non normale dei dati per il test di normalità di Shapiro-Wilk, il test statistico non parametrico di test di Mann-Whitney (anche noto come test U di Mann-Whitney) con livello di significatività pari a $p\text{-value} < 0,05$.

Dall'analisi è emerso che tra il Gruppo 1 e il Gruppo 2 non è presente una differenza statisticamente significativa con la glicemia e i seguenti indici di rapporto BW/MBW, PLW/BW e ZPL/BW. Mentre è presente una differenza statisticamente significativa con il valore dei lattati e l'indice di rapporto dell'area della parte zonata della placenta (PLA/BW). Ovvero all'abbassarsi dell'indice APGAR i lattati misurati aumentano, quindi più un neonato è critico più i lattati sono alti. Mentre per quanto riguarda l'area della placenta risulta che il valore PLA/BW aumenta all'aumentare della criticità del neonato, ovvero abbiamo aree più grandi in neonati critici rispetto ai non critici.

In figura 38 sono riportate le distribuzioni di frequenze dei parametri all'interno dei due gruppi. Mentre in figura 39 sono riportati i grafici a scatola e baffi della glicemia, lattatemia e indici di rapporto BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW divisi in funzione dei gruppi di appartenenza dove ogni casella rappresenta dal primo al terzo quartile (25°-75° percentile) e la barra in ogni casella rappresenta la mediana e i baffi rappresentano i valori estremi.

In fine si è valutato l'influenza dei parametri materni (quali età, peso, parità e glicemia misurata al momento del parto), il tipo di parto, il sesso del neonato, la presentazione fetale (cefalico e podalico), la posizione del feto in utero (corno destro o sinistro), la taglia dell'animale, la dimensione della cucciolata (intesa come grande, normale o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]) e la presenza o assenza di necrosi e il tipo di necrosi evidenziate a carico della placenta istologicamente sull'indice APGAR. L'effetto madre (età, peso, parità e glicemia al parto) è stato misurato attraverso il coefficiente di correlazione lineare di Pearson. Mentre per valutare l'effetto degli altri parametri, essendo delle variabili qualitative, si è andato ad utilizzare il test Chi-Quadrato.

Questa valutazione è stata eseguita prima sull'intera popolazione di 123 neonati indifferentemente dalla gruppo di appartenenza degli stessi, successivamente è stato ripetuto

all'interno del Gruppo 1 (cuccioli non critici con APGAR ≥ 7) e all'interno del Gruppo 2 (cuccioli critici con APGAR ≤ 6).

Da questa analisi si evince che l'APGAR all'interno della popolazione di studio dipende solo dall'età della madre. Nello specifico si è osservato che tra l'indice APGAR e l'età della madre c'è una correlazione negativa, ovvero il punteggio APGAR si abbassa all'aumentare dell'età della madre al momento del parto (indice di correlazione negativo). Analizzando la dipendenza dell'APGAR dai parametri sopra elencati all'interno dei due gruppi si è osservato che l'APGAR nel Gruppo 1 non dipende da nessun parametro, mentre all'interno del Gruppo 2 viene confermata la correlazione negativa con l'età della madre.

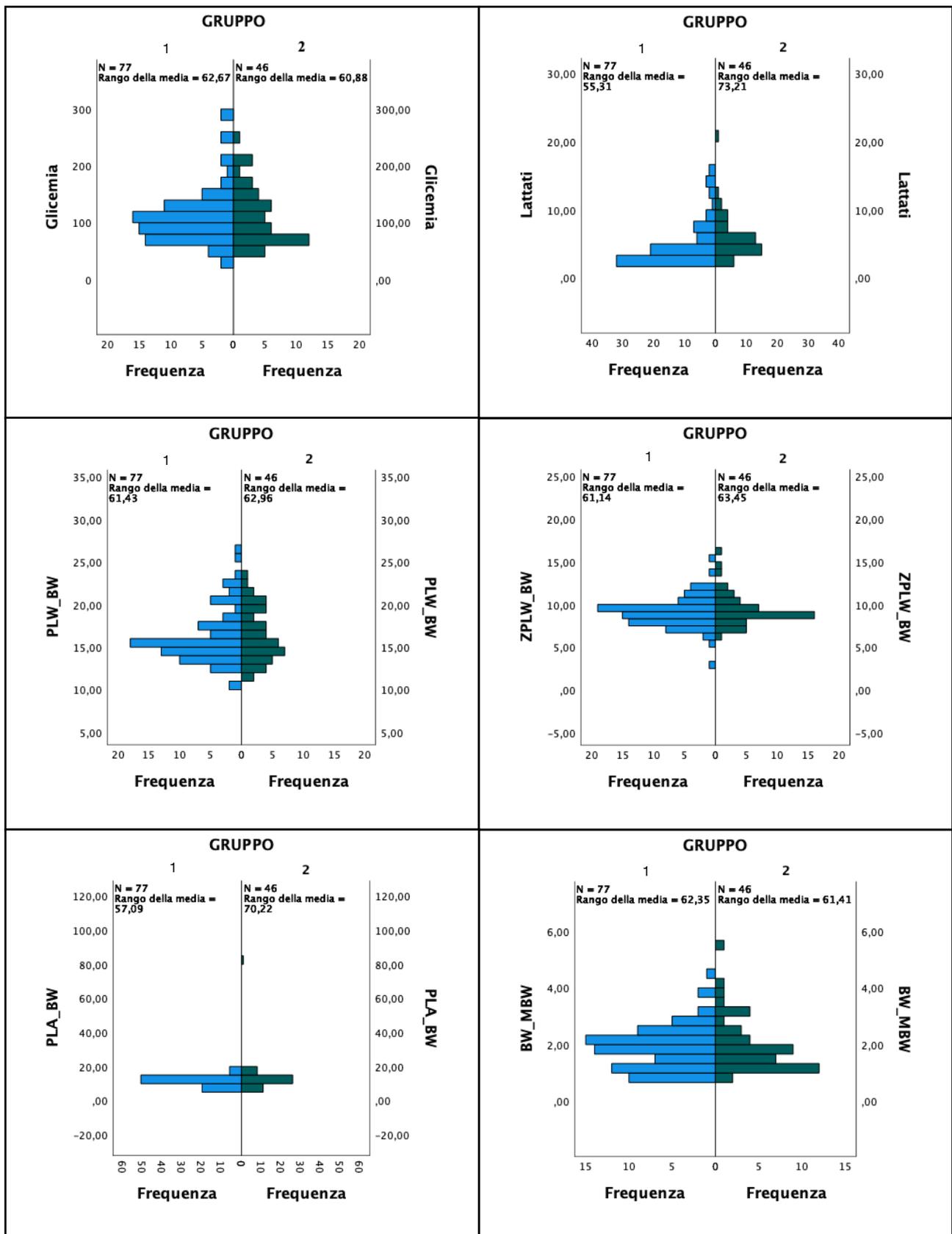


FIGURA 38: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELLA GLICEMIA, DEI LATTATI, E DEGLI INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW E PLA/BW ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 .

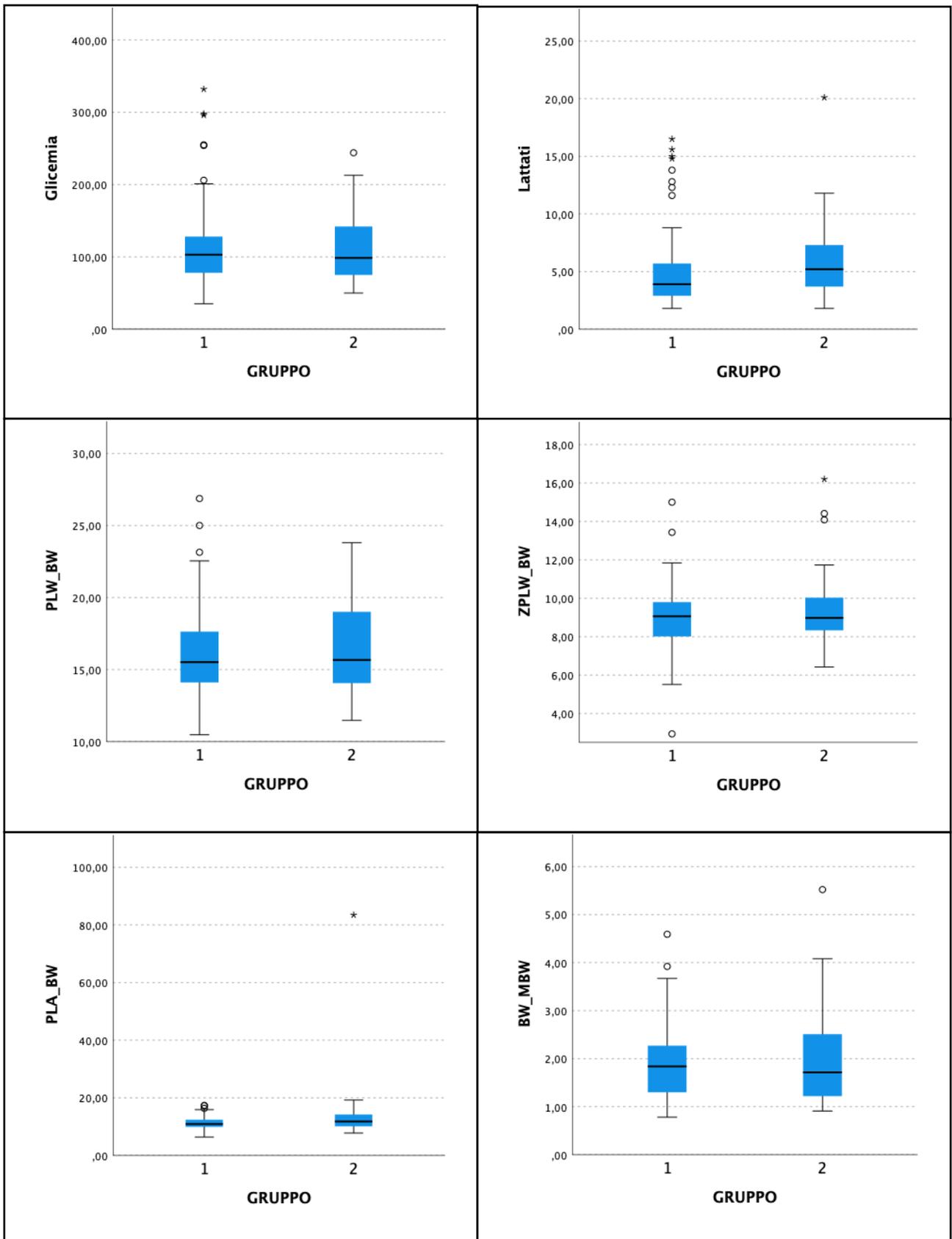


FIGURA 39: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELLA GLICEMIA, LATTATEMIA E INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Studio statistico 3

In questo studio statistico si è ripetuto quanto fatto nello studio statistico 2, ma si è divisa la popolazione in 3 diversi gruppi di criticità sempre in funzione dell'indice APGAR così come definiti dal gruppo di studio della Veronesi et al.[12]:

- Gruppo 1: neonati non critici che presentano un APGAR score ≥ 7 ;
- Gruppo 2: neonati moderatamente critici che presentano un APGAR score compreso tra 4 e 6;
- Gruppo 3: neonati critici che presentano un APGAR score ≤ 3 .

Le dimensioni dei tre gruppi risultano essere di 77 neonati per il Gruppo 1, 32 nel Gruppo 2 e 14 nel Gruppo 3.

Si è proceduto ad analizzare l'eventuale presenza di una relazione tra i tre gruppi con i parametri ematici del neonato (glicemia e la lattatemia), dati clinici (peso espresso come rapporto BW/MBW) e parametri macroscopici della placenta (PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW).

In tabella 8 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri all'interno dei tre gruppi.

Presentando i dati una distribuzione non lineare per il test di Shapiro-Wilk si è utilizzato per l'analisi il test statistico non parametrico di Kruskal-Wallis con livello di significatività pari a $p\text{-value} < 0,05$.

Dall'analisi è emerso che tra i tre gruppi non è presente una differenza statisticamente significativa con la glicemia e i seguenti indici di rapporto BW/MBW, PLW/BW, ZPL/BW e PLA/BW. Mentre è presente una differenza statisticamente significativa con il valore dei lattati, in particolare si evince una differenza statisticamente significativa tra il Gruppo 1 e il Gruppo 3 e il Gruppo 2 e Gruppo 3, mentre confrontando il Gruppo 1 con il Gruppo 2 non è presente una differenza statisticamente significativa.

TABELLA 8: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici APGAR \geq 7	Glicemia [mg/dl]	115,63 \pm 58,58	103 (50)	35 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	5,14 \pm 3,54	3,9 (2,8)	1,80 - 16,5
	BW/MBW [%]	1,9 \pm 0,75	1,84 (0,96)	0,78 - 4,59
	PLW/BW [%]	16,25 \pm 3,2	15,51 (3,51)	10,47 - 26,87
	ZPLW/BW [%]	9,03 \pm 1,8	9,05 (1,80)	2,94 - 15
	PLA/BW [%]	11,19 \pm 2,29	10,88 (2,49)	6,39 - 17,38
Gruppo 2: neonati critici APGAR 4 - 6	Glicemia [mg/dl]	108,84 \pm 45,36	93 (63,75)	54 - 213
	Lattatemia [mmol/L]	4,90 \pm 1,74	4,7 (2,15)	2,9 - 20,1
	BW/MBW [%]	1,82 \pm 0,8	1,69 (1,03)	0,9 - 4,08
	PLW/BW [%]	16,72 \pm 3,21	14,36 (3,88)	12,5 - 23,80
	ZPLW/BW [%]	9,15 \pm 1,5	9,23 (2,44)	7,4 - 14,41
	PLA/BW [%]	14,19 \pm 2,3	11,99 (3,14)	8,44 - 19,22
Gruppo 3: neonati critici APGAR \leq 3	Glicemia [mg/dl]	119,07 \pm 07	119 (68,25)	50 - 244
	Lattatemia [mmol/L]	8,28 \pm 4,37	7,45 (5,22)	2,90 - 20,10
	BW/MBW [%]	2,33 \pm 1,25	1,88 (1,56)	1,01 - 5,51
	PLW/BW [%]	15,70 \pm 3,04	14,36 (3,88)	12,5 - 23,80
	ZPLW/BW [%]	9,85 \pm 2,3	9,23 (2,44)	7,4 - 16,20
	PLA/BW [%]	12,56 \pm 3,14	11,98 (4,56)	8,44 - 19,22

In figura 40 sono riportati i grafici a scatola e baffi della glicemia, lattatemia e indici di rapporto BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW divisi in funzione dei tre gruppi di appartenenza dove ogni casella rappresenta dal primo al terzo quartile (25°-75° percentile), la barra in ogni casella rappresenta la mediana e i baffi rappresentano i valori estremi.

Così come per lo studio statistico 2 si è andato a studiare l'esistenza di un eventuale dipendenza dell'indice APGAR all'interno dei tre gruppi con i parametri materni (peso, età, glicemia prima del parto e parità) mediante il coefficiente di correlazione lineare di Pearson, mentre attraverso il test del Chi-quadrato con il tipo di parto, il sesso del neonato, la presentazione fetale (cefalico e podalico), la posizione del feto in utero (corno destro o sinistro), la taglia dell'animale, la dimensione della cucciolata (intesa come grande, normale

o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]) e la presenza o assenza di necrosi e il tipo di necrosi evidenziate a carico della placenta istologicamente. Dai risultati si evince che l'APGAR all'interno della popolazione di studio del Gruppo 1 e 3 non dipende da nessun parametro, mentre per quanto riguarda il Gruppo 2 (cuccioli moderatamente critici con APGAR compreso tra 4 e 6) esiste una correlazione negativa con l'età della madre, ovvero all'aumentare dell'età della madre il punteggio APGAR diminuisce.

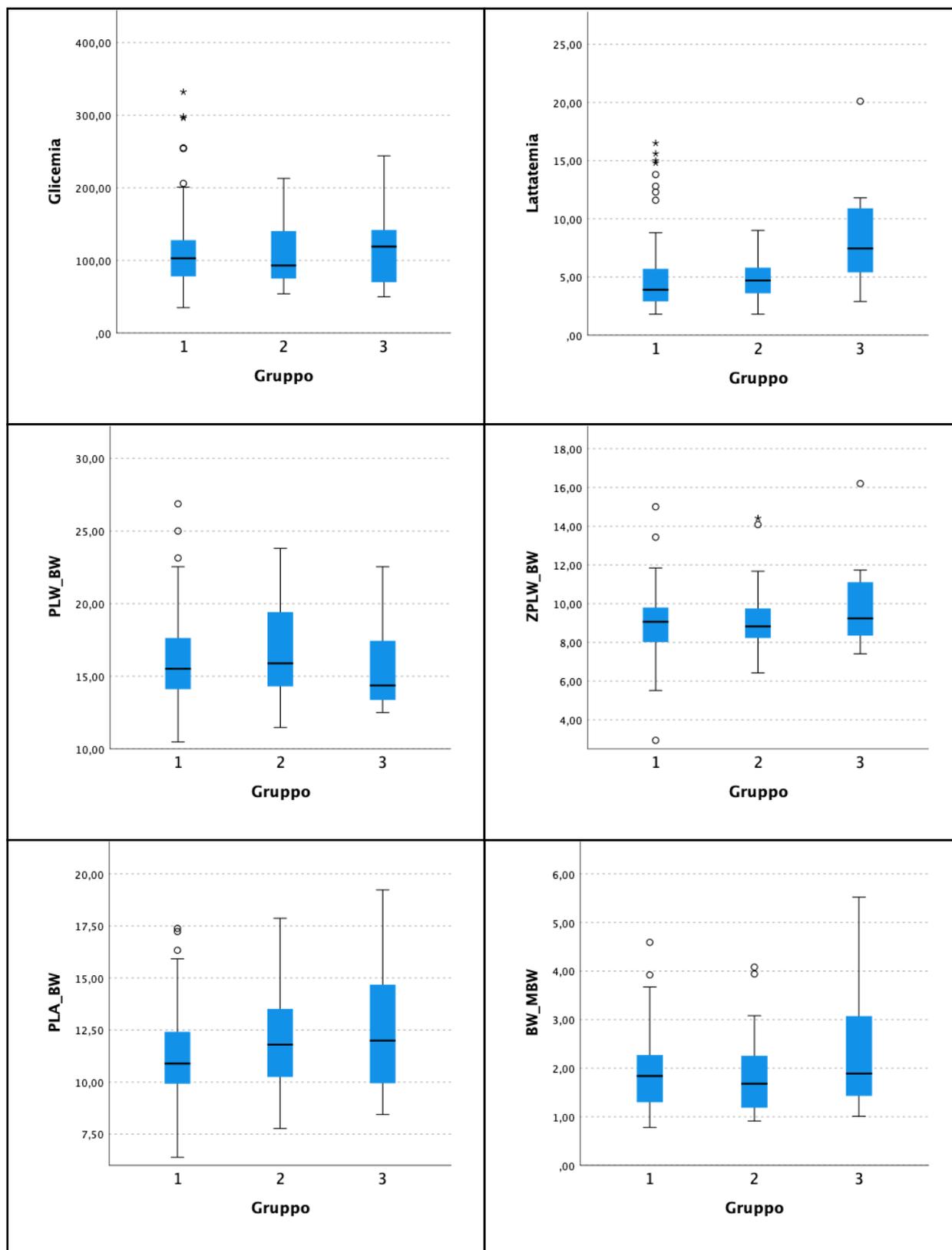


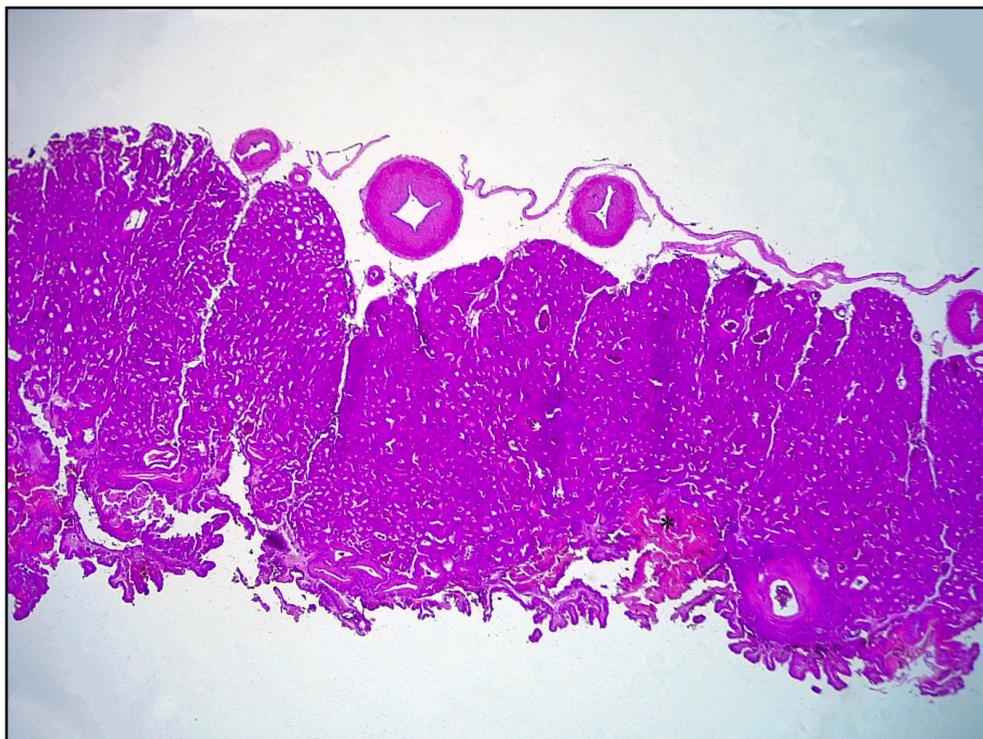
FIGURA 40: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELLA GLICEMIA, LATTATEMIA E INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI DEBOLMENTE CRITICI CON APGAR COMPRESO TRA 4 E 6, GRUPPO 3 CRITICI CON APGAR ≤ 3 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Studio statistico 4

In un lavoro pubblicato dal nostro gruppo di studio [113], si è osservato che tra le principali lesioni presenti a livello placentare, ovvero necrosi, calcificazione e presenza di leucociti intravascolari, solo la presenza di necrosi, ed in particolare di necrosi multifocale-confluente era associata a un rischio più elevato di morte entro i primi 7 giorni di vita. Pertanto si è deciso di ricercare, all'esame istologico, solamente le aree necrotiche e dividere la popolazione di studio in funzione della sua presenza o assenza. Questo ha permesso di ottenere 3 gruppi:

- Gruppo 0: assenza di necrosi, dimensione del campione è pari a 29;
- Gruppo 1: presenza di necrosi focali, dimensione del campione è pari a 45;
- Gruppo 2: presenza di necrosi multifocali, dimensione del campione è pari a 49.

Tutte le placentate analizzate, come determinato dall'esame istologico, erano coerenti con l'età gestazionale. Le lesioni di necrosi riscontrate sono delle lesioni degenerative-necrotiche con distribuzione lobulare (focale), cioè da una a tre lamelle vicine (figura 41), o multilobulare (confluenti multifocale o multifocale), cioè ampia area di necrosi associata o meno a emorragia (figura 42).



**FIGURA 41: IMMAGINE ISTOLOGICA DI PLACENTA CON NECROSI FOCALILE (*).
COLORAZIONE EMATOSSILINA-EOSINA, 1,6X.**

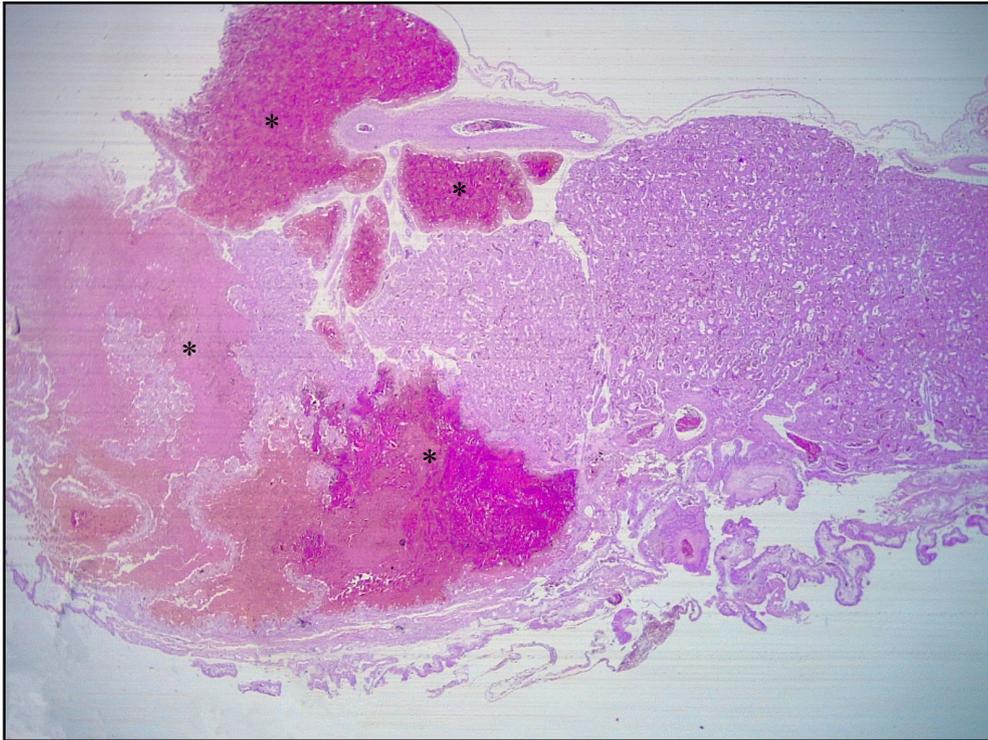


FIGURA 42: IMMAGINE ISTOLOGICA DI PLACENTA CON NECROSI MULTIFOCAL (*).
COLORAZIONE EMATOSSILINA-EOSINA, 1,6X.

In tabella 9 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri all'interno dei tre gruppi.

Presentando i dati una distribuzione non lineare per il test di Shapiro-Wilk si è utilizzato per l'analisi il test statistico non parametrico di Kruskal-Wallis con livello di significatività pari a $p\text{-value} < 0,05$.

Dall'analisi statistica non è emerso nessuna differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi. In figura 43, 44, 45 sono riportati rispettivamente i grafici a scatola e baffi dei parametri ematici (glicemia e lattatemia), dei parametri clinici (indice APGAR e del peso del neonato espresso come indice di rapporto con il peso materno) e dei parametri macroscopici della placenta (peso dell'intera placenta, peso della parte zonata, area della parte zonata espressi come indici di rapporto con il peso del neonato).

TABELLA 9: MEDIE ± SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media ± sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 0: necrosi assente Dimensione campione: 29	APGAR score	7,10 ± 3	9 (4)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	128,89 ± 57,5	116 (59)	59 - 298
	Lattatemia [mmol/L]	5,67 ± 3,12	4,4 (4,3)	2,5 - 13,8
	BW/MBW [%]	1,88 ± 1	1,77 (0,88)	0,9 - 5,51
	PLW/BW [%]	16,09 ± 3,22	14,88 (3,92)	12,05 - 23,80
	ZPLW/BW [%]	8,77 ± 1,91	8,68 (2,47)	2,94 - 11,83
	PLA/BW [%]	11,28 ± 2,72	10,82 (4,7)	6,39 - 16,66
Gruppo 1: necrosi focale Dimensione campione: 45	APGAR score	7,57 ± 2,52	9 (4)	2 - 10
	Glicemia [mg/dl]	105,02 ± 43,7	98 (45)	45 - 255
	Lattatemia [mmol/L]	5,61 ± 3,61	4,4 (3,7)	1,8 - 20,1
	BW/MBW [%]	1,85 ± 0,87	1,68 (1,08)	0,78 - 4,6
	PLW/BW [%]	16,69 ± 3,23	15,66 (4,53)	12,25 - 26,86
	ZPLW/BW [%]	9,26 ± 1,82	9 (1,78)	6,42 - 14,41
	PLA/BW [%]	11,55 ± 2,41	11,09 (2,5)	7,97 - 17,86
Gruppo 2: necrosi multifocale Dimensione campione: 49	APGAR score	6,95 ± 2,74	8 (3)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	114,08 ± 60, 84	93 (67)	67 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	5,12 ± 3,45	4,1 (2,5)	1,8 - 16,5
	BW/MBW [%]	2,04 ± 0,7	2,06 (1,06)	0,81 - 3,66
	PLW/BW [%]	16,09 ± 3,13	15,61 - 83,16)	10,46 - 25
	ZPLW/BW [%]	9,28 ± 1,82	9,09 (1,18)	5,51 - 16,19
	PLA/BW [%]	13,19 ± 10,5	11,16 (2,85)	7,76 - 83,45

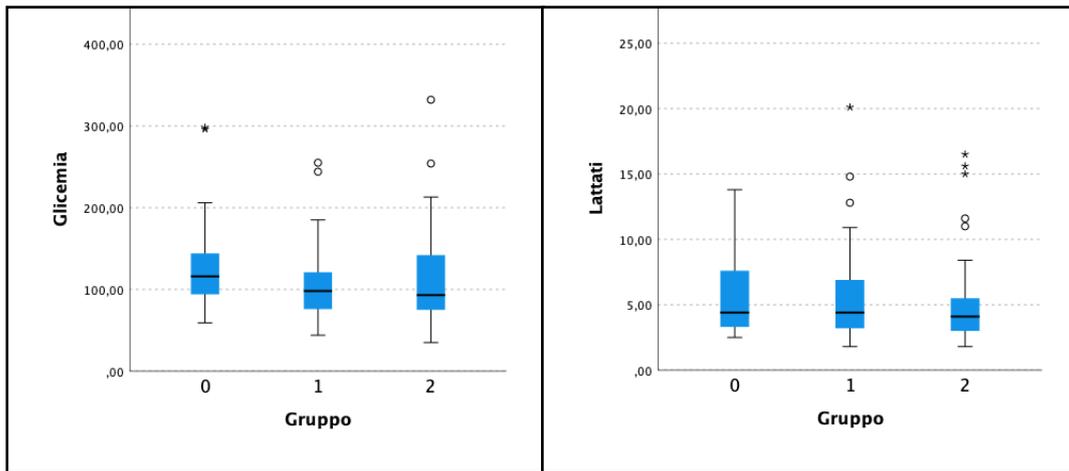


FIGURA 43: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI EMATICI (GLICEMIA E LATTATEMIA) IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 0 PLACENTE CON ASSENZA DI NECROSI, GRUPPO 2 PLACENTE CON NECROSI FOCALI E GRUPPO 3 PLACENTE CON NECROSI MULTIFOCALI OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

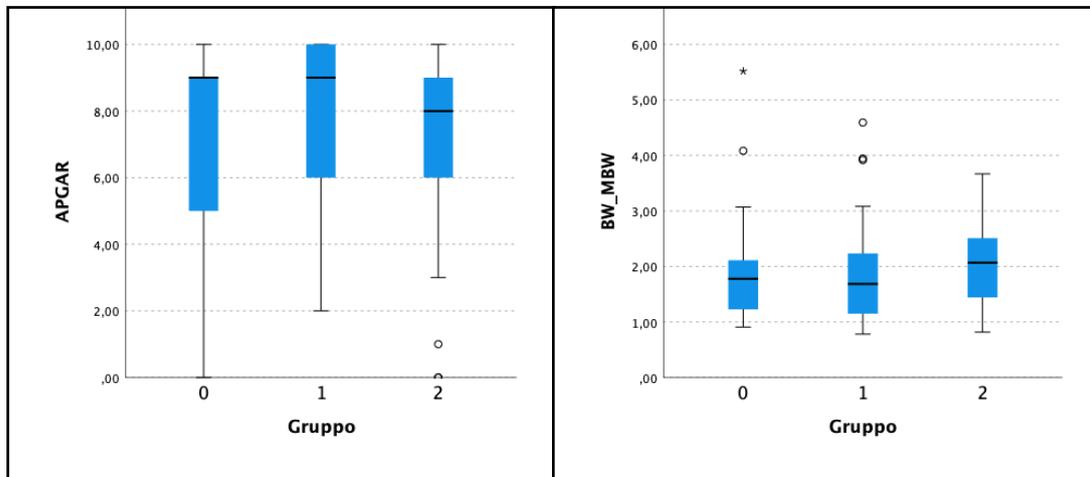


FIGURA 44: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI CLINICI (APGAR SCORE E PESO DEL NEONATO ESPRESSO COME INDICE DI RAPPORTO CON IL PESO MATERNO) IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 0 PLACENTE CON ASSENZA DI NECROSI, GRUPPO 2 PLACENTE CON NECROSI FOCALI E GRUPPO 3 PLACENTE CON NECROSI MULTIFOCALI OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

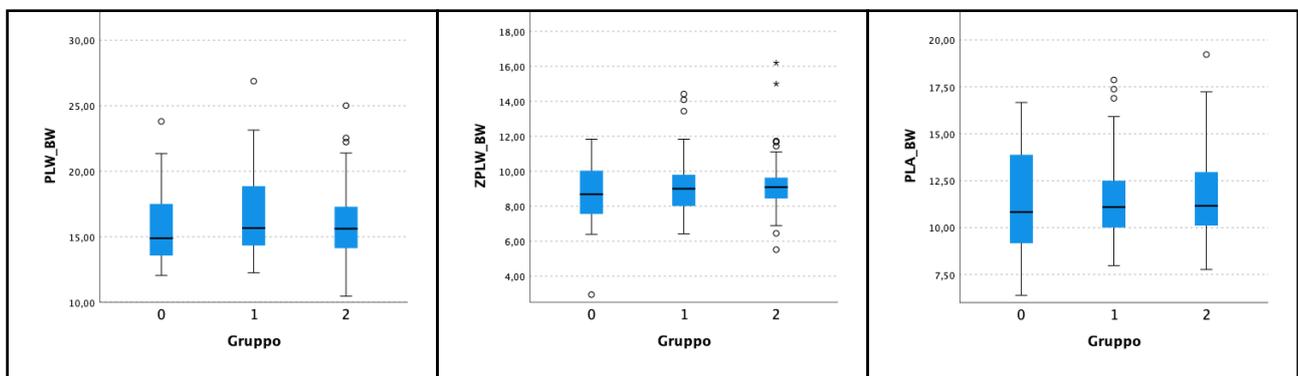


FIGURA 45: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI MACROSCOPICI DELLA PLACENTA (PESO DELLA PLACENTA, PESO DELLA PARTE ZONATA E AREA DELLA PARTE ZONATA ESPRESSI COME INDICI DI RAPPORTO CON IL PESO DEL NEONATO) IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 0 PLACENTE CON ASSENZA DI NECROSI, GRUPPO 2 PLACENTE CON NECROSI FOCALI E GRUPPO 3 PLACENTE CON NECROSI MULTIFOCALI. OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Si è studiata l'eventuale dipendenza della presenza o assenza e del tipo di necrosi individuata con i parametri materni (età, peso, glicemia e parità), i parametri legati al neonato quali sesso, presentazione fetale (cefalico o podalico), corno uterino d'appartenenza, la dimensione della cucciolata (intesa come grande, normale o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]) e/o il tipo di taglio cesareo eseguito. A tal fine si è utilizzato il coefficiente di correlazione lineare di Pearson per le variabili numeriche e il test del Chi-quadrato per quelle qualitative.

Da questa analisi si è osservato una dipendenza della presenza/assenza e tipo di necrosi con il tipo di taglio cesareo, da cui si evince, come si può vedere nella tavola di contingenza (tabella 10), che:

- placente prive di necrosi si osservano principalmente in corso di taglio cesareo programmato;
- necrosi focali si osservano maggiormente in corso di taglio cesareo programmato rispetto a quello d'urgenza;
- necrosi multifocali si osservano maggiormente in corso di taglio cesareo d'urgenza.

TABELLA 10: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA AL TIPO DI TAGLIO CESAREO ESEGUITO.

	Gruppo 1: no necrosi	Gruppo 2: necrosi focali	Gruppo 2: necrosi multifocali	Totale
Taglio cesareo programmato	20	28	21	69
Taglio cesareo d'urgenza	9	17	28	54
Totale	29	45	49	123

Studio statistico 5

Groppetti et al. [13] hanno determinato un valore soglia pari a 5 mmol/L per la lattatemia al fine di distinguere neonati sani (normolattatemici, con valori < 5mmol/l) da neonati che presentano segni di stress e quindi considerati critici (iperlattatemici, con valori > 5 mmol/l).

In questo studio sperimentale si procede andando a dividere i neonati in due gruppi in funzione di questo valore di cut-off:

- Gruppo 1: neonati non critici che presentano dei lattati < 5mmol/L;
- Gruppo 2: neonati critici che presentano dei lattati > 5mmol/L.

In tabella 11 sono riportati le dimensioni dei campioni ed i valori dei lattati espressi in media e mediana all'interno due gruppi.

TABELLA 11: VALORI DEI LATTATI ESPRESSI IN MEDIA E MEDIANA ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI

	Media ± sd [mmol/l]	Mediana (IQR) [mmol/l]	Range [mmol/l]	Dimensione campione
Gruppo 1	3,38 ± 0,84	3,25 (1,2)	1,80 - 4,90	74
Gruppo 2	8,52 ± 3,53	7,50 (4,1)	5,10- 20,10	49

I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico di Mann-Whitney (anche noto come test U di Mann-Whitney) con livello di significatività pari a p-value < 0,05, in quanto presentano una distribuzione non normale per il test di normalità di Shapiro-Wilk.

Dall'analisi statistica non si evidenzia nessuna differenza statisticamente significativa tra il gruppo dei critici e non critici per quanto riguarda i parametri macroscopici della placenta, mentre si osserva una differenza statisticamente significativa tra i valori dell'APGAR score, della glicemia e del peso. In particolare, come si evince anche dalla tabella 12, si ha che:

- cuccioli appartenenti al Gruppo 1 possono essere definiti non critici se si considera l'indice APGAR;
- cuccioli appartenenti al Gruppo 1 presentano un peso corporeo più alto rispetto ai neonati del Gruppo 2

- cuccioli appartenenti al Gruppo 1 presentano una glicemia più bassa rispetto ai cuccioli critici.

Nelle figure 46 e 47 sono riportati rispettivamente i grafici di distribuzione dei parametri considerati messi a confronto tra i due gruppi e il grafico a scatola e baffi degli stessi.

TABELLA 12: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici Lattati < 5 mmol/L Dimensione campione: 74	APGAR	7,81 \pm 2,26	9 (3)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	100,63 \pm 37,96	93,5 (49,75)	39 - 206
	BW/MBW [%]	2,13 \pm 0,79	2,07 (0,84)	0,84 - 5,59
	PLW/BW [%]	16,22 \pm 3,02	15,43 (3,32)	10,47 - 23,8
	ZPLW/BW [%]	9,17 \pm 1,76	9,04 (2,29)	5,51 - 16,19
	PLA/BW[%]	12,63 \pm 8,74	11,22 (2,77)	6,39 - 83,45
Gruppo 2: neonati critici Lattati > 5 mmol/L Dimensione campione: 49	APGAR	6,32 \pm 3,11	6 (5)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	134,83 \pm 68,41	116 (68,41)	35 - 332
	BW/MBW [%]	1,63 \pm 0,84	1,36 (0,84)	0,78 - 5,51
	PLW/BW [%]	16,44 \pm 3,42	15,77 (5,06)	11,63 - 26,86
	ZPLW/BW [%]	9,13 \pm 1,98	9,04 (2,28)	2,94 - 15
	PLA/BW[%]	11,4 \pm 2,40	10,87 (2,95)	7,91 - 16,54

Valutando l'effetto madre (età, peso, glicemia al momento del parto e parità), l'effetto cucciolata (dimensione della cucciolata, intesa come grande, normale o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]), il tipo di parto, il sesso del neonato, la presentazione fetale (cefalico o podalico) e la posizione del feto a livello uterino (corno di destra o sinistra) risulta che: la lattatemia è influenzato positivamente dal peso e dall'età della madre al momento del parto in quanto si è evidenziato un indice di correlazione di Pearson positivo, ed in base al Chi quadrato è presente un effetto cucciolata ed esiste una relazione con la taglia dell'animale e la presentazione fetale. Difatti, così come mostrano le tabelle 13, 14, 15, che riportano le tavole di contingenza di questi tre parametri, il numero dei cuccioli critici (lattatemia >5 mmol/L) aumenta all'aumentare della dimensione della cucciolata e alla taglia del soggetto, mentre per quanto riguarda la presentazione fetale si evince che neonati podalici hanno più probabilità di presentare alti livelli di lattati alla nascita.

**TABELLA 13 : TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA
ALLA PRESENTAZIONE FETALE (CEFALICO/PODALICO)**

	Gruppo 1: non critici	Gruppo 2: critici	Totale
cefalico	49	23	72
podalico	24	26	50
totale	73	49	122

**TABELLA 14: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA
ALLA TAGLIA DELL'ANIMALE (PICCOLA/MEDIO/GRANDE)**

	Gruppo 1: non critici	Gruppo 2: critici	Totale
piccola	12	3	15
medio	46	25	71
grande	16	21	37
totale	74	49	123

**TABELLA 15: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA
ALLA DIMENSIONE CUCCIOLATA (PICCOLA/NORMALE/GRANDE)**

	Gruppo 1: non critici	Gruppo 2: critici	Totale
piccola	24	12	36
normale	31	12	43
grande	19	25	44
totale	74	49	123

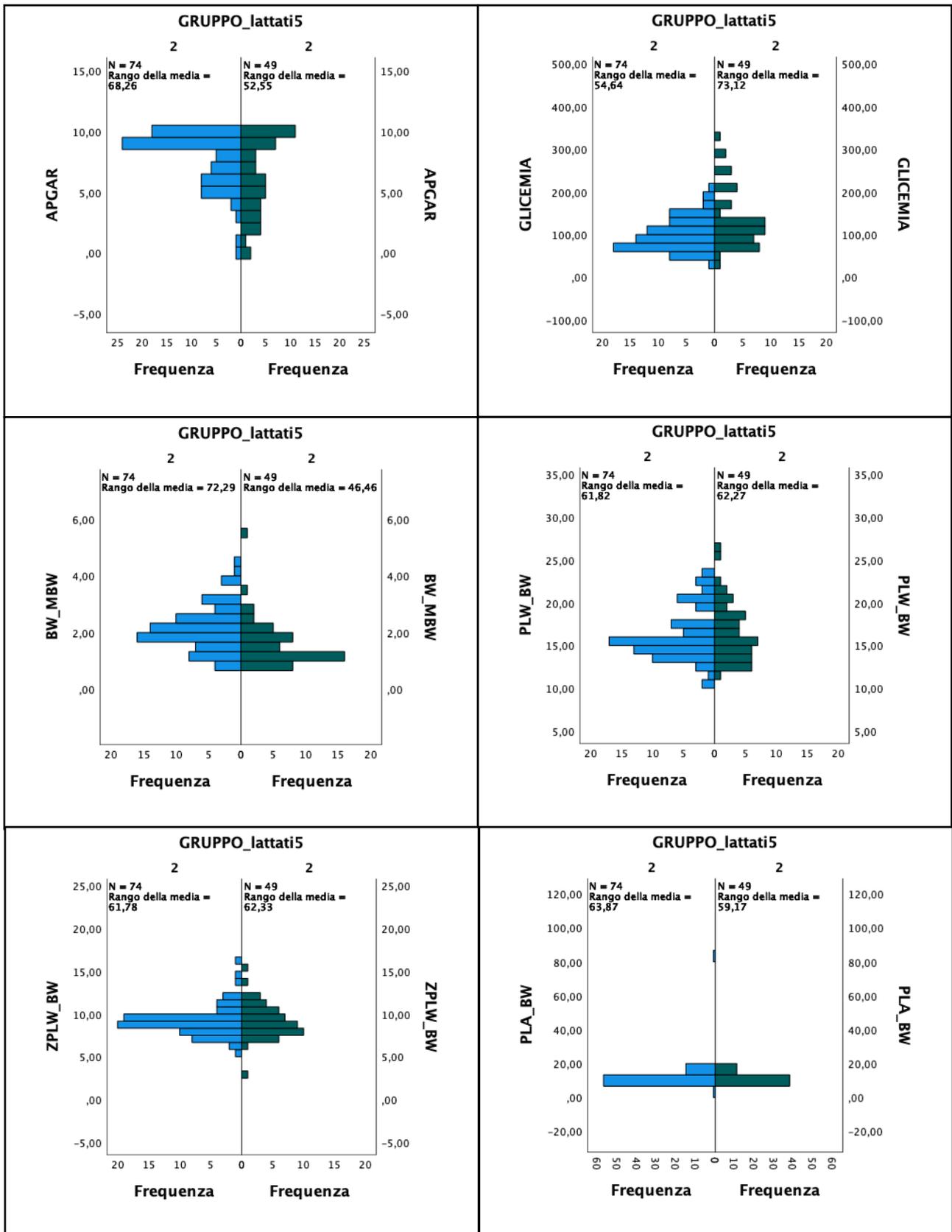


FIGURA 46: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA, E DEGLI INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW E PLA/BW ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON LATTATI < 5 MMOL/L, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON LATTATI > 5MMOL/L.

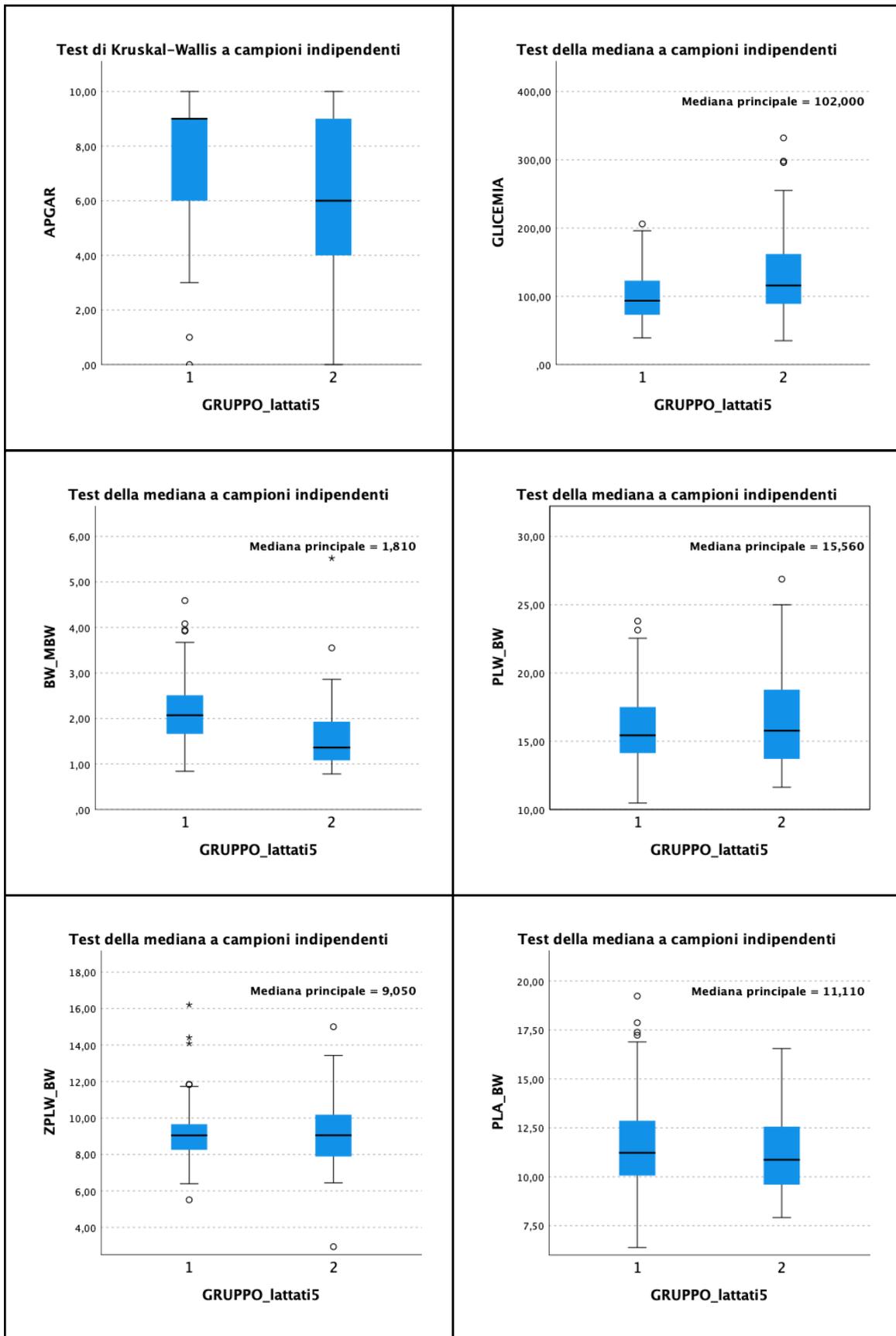


FIGURA 47: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA E INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON LATTATI <5 MMOL/L, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON LATTATI > 5 MMOL/L. OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Dallo studio statistico 2 e 3 condotto in questo studio si è evidenziato una differenza statisticamente significativa tra l'indice Apgar e i lattati.

In particolare dallo studio statistico 2 si individua il valore massimo della lattatemia presente nei neonati definiti non critici in funzione dell'APGAR score, che risulta essere pari a 6,7 mmol/L. Pertanto si è deciso di ripetere lo studio sopra descritto dividendo però la popolazione dello studio in due gruppi di neonati così descritti:

- Gruppo 1: neonati non critici con lattati < 6,7 mmol/L;
- Gruppo 2: neonati critici con lattati > 6,7 mmol/L.

In tabella 16 sono riportati i valori dei lattati espressi in media e mediana all'interno due gruppi.

TABELLA 16: VALORI DEI LATTATI ESPRESSI COME MEDIA \pm SD E MEDIANA (IQR) E RANGE ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI

	Media \pm sd [mmol/l]	Mediana (IQR) [mmol/l]	Range [mmol/l]	Dimensione campione
Gruppo 1	3,84 \pm 1,2	3,7 (1,8)	1,80 - 6,50	93
Gruppo 2	10,33 \pm 3,42	8,8 (4,57)	6,80 - 20,10	30

Vista la distribuzione non normale dei dati per il test di normalità di Shapiro-Wilk si utilizzato il test statistico non parametrico di Mann-Whitney con livello di significatività pari a p-value < 0,05.

Dall'analisi statistica risulta che tra il gruppo dei critici e non critici, a differenza di quanto è emerso dalla precedente analisi, esiste una differenza statisticamente significativa solo tra i valori della glicemia e del peso del neonato alla nascita. In particolare, come si evince anche dalla tabella 17, otteniamo risultati analoghi a quanto precedentemente osservato con un cut-off value dei lattati pari a 5 mmol/L:

- neonati appartenenti al gruppo 1 presentano un peso corporeo più alto rispetto ai neonati del gruppo 2
- neonati appartenenti al gruppo 1 presentano una glicemia più bassa rispetto ai neonati critici del gruppo 2.

Nelle figure 48 e 49 sono riportati rispettivamente i grafici di distribuzione dei parametri considerati messi a confronto tra i due gruppi e il grafico a scatola e baffi degli stessi.

TABELLA 17: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici Lattati < 6,7 mmol/L Dimensione campione: 93	APGAR	7,41 \pm 2,39	8 (3)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	103,25 \pm 39,10	95 (48)	39 - 213
	BW/MBW [%]	2,04 \pm 0,80	1,87 (1,02)	0,84 - 4,59
	PLW/BW [%]	16,29 \pm 2,95	15,61 (5,04)	10,46 - 23,8
	ZPLW/BW [%]	9,07 \pm 1,7	8,98 (1,59)	5,51 - 16,19
	PLA/BW[%]	12,37 \pm 7,87	11,20 (2,69)	6,39 - 83,45
Gruppo 2: neonati critici Lattati > 6,7 mmol/L Dimensione campione: 30	APGAR	6,60 \pm 3,53	8 (6,75)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	144,36 \pm 78,23	119 (93,25)	35 - 332
	BW/MBW [%]	1,59 \pm 0,89	1,36 (0,84)	0,78 - 5,51
	PLW/BW [%]	16,38 \pm 3,83	15,25 (5,03)	11,63 - 26,86
	ZPLW/BW [%]	9,41 \pm 2,24	9,41 (2,72)	2,94 - 15
	PLA/BW[%]	11,43 \pm 2,50	10,67 (3,74)	8,01 - 16,54

Valutando l'effetto madre (età, peso, glicemia al momento del parto e parità), l'effetto cucciolata (dimensione della cucciolata, intesa come grande, normale o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]), il tipo di parto, il sesso del neonato, la presentazione fetale (cefalico o podalico) e dove era allocato a livello uterino (corno di destra o sinistra) si ottiene che: la lattatemia è influenzata positivamente dalla parità, dal peso ed età della madre al momento del parto in quanto presente un indice di correlazione di Pearson positivo, ed in base al Chi quadrato è presente un effetto cucciolata ed una relazione con la taglia dell'animale e la presentazione fetale. Difatti, così come mostrano le tabelle 18, 19, 20, che riportano le tavole di contingenza di questi tre parametri, il numero dei cuccioli critici, ovvero che presentano un lattato maggiore di 6,7 mmol/L, aumenta all'aumentare della dimensione della cucciolata e alla taglia del soggetto, mentre per quanto riguarda la presentazione fetale si osserva che neonati podalici hanno più probabilità di essere iperlattatemici alla nascita. I risultati ottenuti risultano pertanto sovrapponibili a quanto emerso per lattatemia con valore di cut-off pari a 5 mmol/L.

**TABELLA 18: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA
ALLA TAGLIA (PICCOLA, MEDIA, GRANDE)**

	Gruppo 1: non critici	Gruppo 2: critici	Totale
piccola	14	1	15
Medio	56	15	71
Grande	23	14	37
Totale	93	30	123

**TABELLA 19: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA
ALLA DIMENSIONE DELLA CUCCIOLATA (PICCOLA, NORMALE, GRANDE)**

	Gruppo 1: non critici	Gruppo 2: critici	Totale
Piccola	31	5	36
Normale	36	7	43
Grande	26	18	44
Totale	93	30	123

**TABELLA 20: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA
ALLA PRESENTAZIONE FETALE(CEFALICO O PODALICO)**

	Gruppo 1: non critici	Gruppo 2: critici	Totale
Cefalico	60	12	72
Podalico	32	18	50
Totale	92	30	122

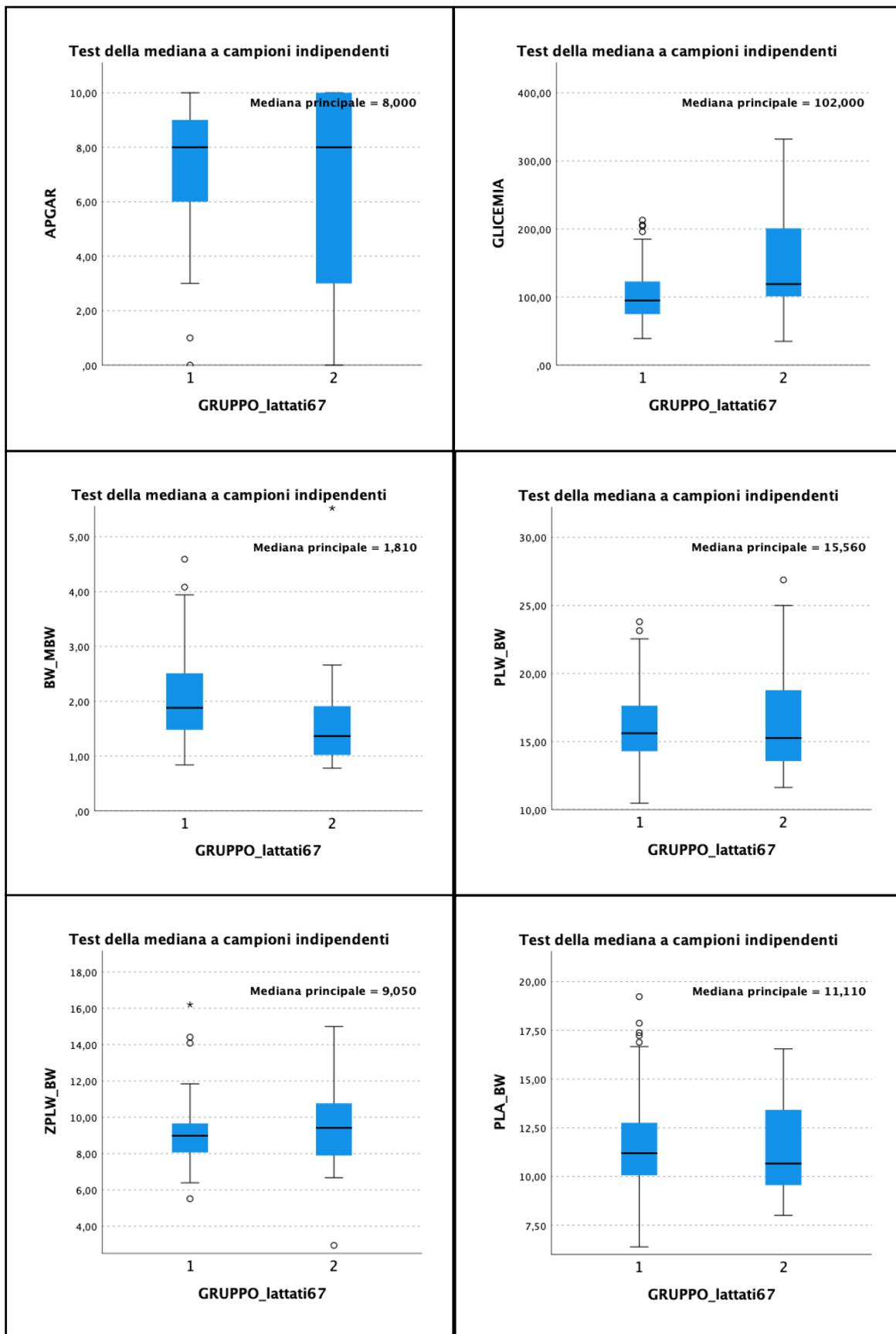


FIGURA 48: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA, E DEGLI INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW E PLA/BW ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON LATTATI < 6,7 MMOL/L, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON LATTATI > 6,7 MMOL/L.

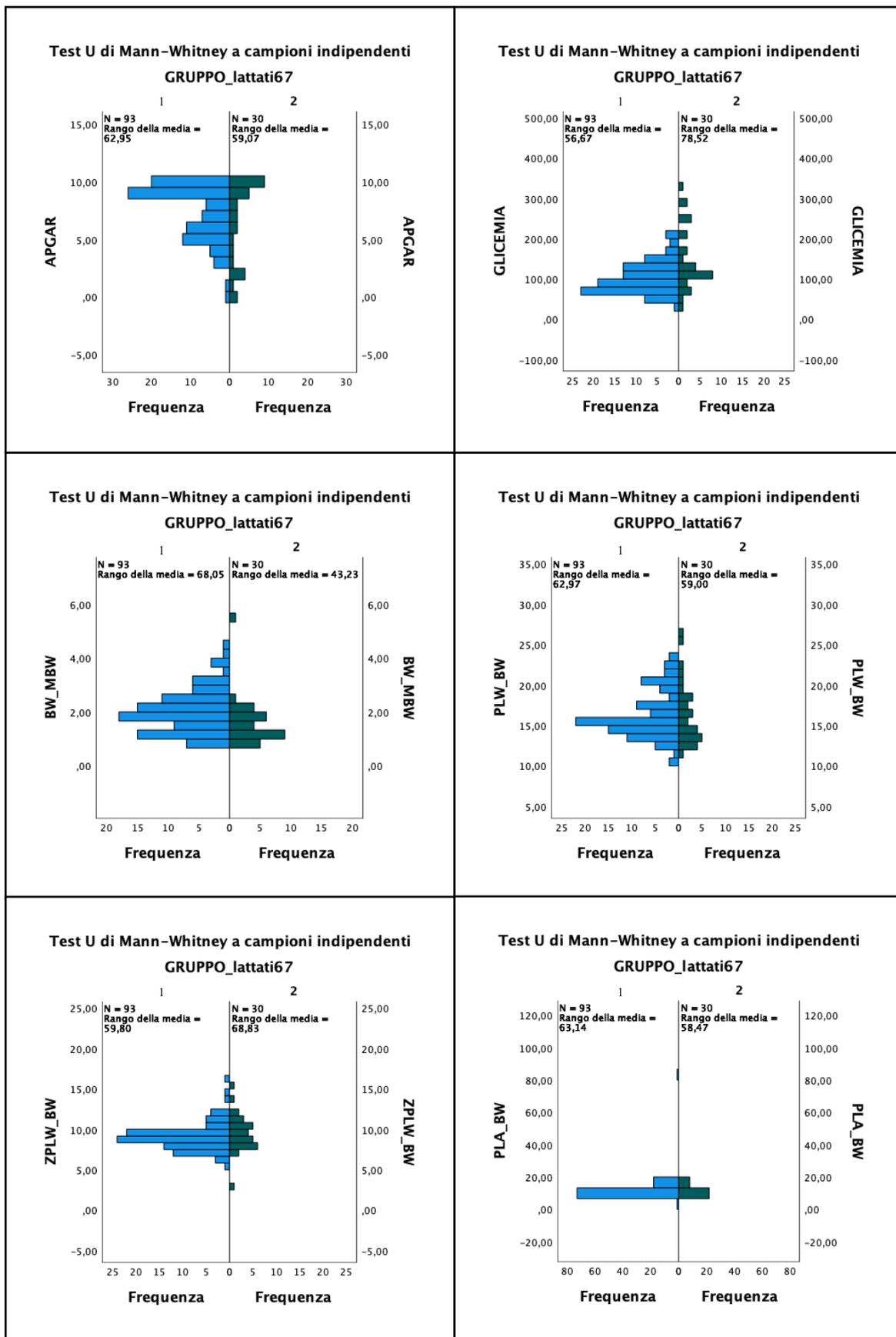


FIGURA 49: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA E INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON LATTATI <6,7 MMOL/L, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON LATTATI > 6,7 MMOL/L. OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Studio statistico 6

Su una popolazione ridotta di casi, ovvero 59 neonati, prendendo in riferimento l'indice APGAR come parametro per definire un neonato critico alla nascita si divide la popolazione di studio in 2 gruppi:

- Gruppo 1: neonati non critici che presentano un APGAR score ≥ 7 ;
- Gruppo 2: neonati critici che presentano un APGAR score ≤ 6 .

Le dimensioni dei due gruppi risultano essere di 41 neonati per il Gruppo 1 e 18 per il Gruppo 2.

Si procede poi ad analizzare l'eventuale presenza di una relazione tra i gruppi con i parametri ematici del neonato (glicemia misurata alla nascita prima dell'assunzione del colostro e lattatemia), i suoi dati clinici (BW/MBW) e i parametri macroscopici della placenta (VOL/BW, PLW/BW, ZPLW/BW e PLA/BW).

In tabella 21 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri all'interno dei due gruppi.

I dati sono stati analizzati mediante il test statistico non parametrico di Mann-Whitney con livello di significatività pari a $p\text{-value} < 0,05$, in quanto presentano una distribuzione non normale per il test di normalità di Shapiro-Wilk.

Dall'analisi statistica eseguita non si evidenzia nessuna differenza statisticamente significativa. In figura 50, 51 e 52 sono riportate le distribuzioni dei parametri considerati nell'esame statistico relativamente ai gruppi, mentre in figura 53, 54 e 55 sono riportati i grafici scatola e baffi degli stessi.

Così come effettuato per lo studio sperimentale 2 si procede valutando un eventuale influenza sull'APGAR score dell'effetto madre (età, peso, glicemia al momento del parto e parità), l'effetto cucciolata (dimensione della cucciolata, intesa come grande, normale o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]), del tipo di parto, del sesso del neonato, della presentazione fetale (cefalico o podalico) e il posizionamento del feto a livello uterino

(corno di destra o sinistra). Dai risultati emerge che l'APGAR score non è influenzato da nessuno dei parametri sopra elencati.

TABELLA 21: MEDIE ± SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media ± sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici APGAR ≥ 7	Glicemia [mg/dl]	133, 63 ± 67,68	113 (49)	44 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	6,06 ± 3,97	4,4 (4,4)	1,8 - 15,6
	BW/MBW [%]	1,72 ± 0,61	1,74 (0,96)	0,78 - 3,07
	PLW/BW [%]	16,29 ± 3,26	15,66 (3,39)	10,76 - 26,86
	ZPLW/BW [%]	9,07 ± 1,89	8,44 (1,84)	2,94 - 13,43
	PLA/BW [%]	10,78 ± 2,04	10,65 (3,35)	7,89 - 15,4
	VOL/BW [%]	7,42 ± 1,94	7,8 (2,79)	3,52 - 11,11
Gruppo 3: neonati critici APGAR ≤ 6	Glicemia [mg/dl]	126,27 ± 49,62	121 (65)	65 - 244
	Lattatemia [mmol/L]	6,23 ± 4,4	5,05 (4,2)	1,8 - 20,1
	BW/MBW [%]	1,9 ± 0,73	1,74 (0,98)	0,9 - 3,19
	PLW/BW [%]	16,31 ± 2,84	15,62 (4,44)	10,76 - 26,86
	ZPLW/BW [%]	28,94 ± 7,85	28 (11,25)	15 - 40
	PLA/BW [%]	15,57 ± 17,21	11,39 (3,73)	7,76 - 83,45
	VOL/BW [%]	7,77 ± 2,81	7,86 (1,25)	0 - 14,08

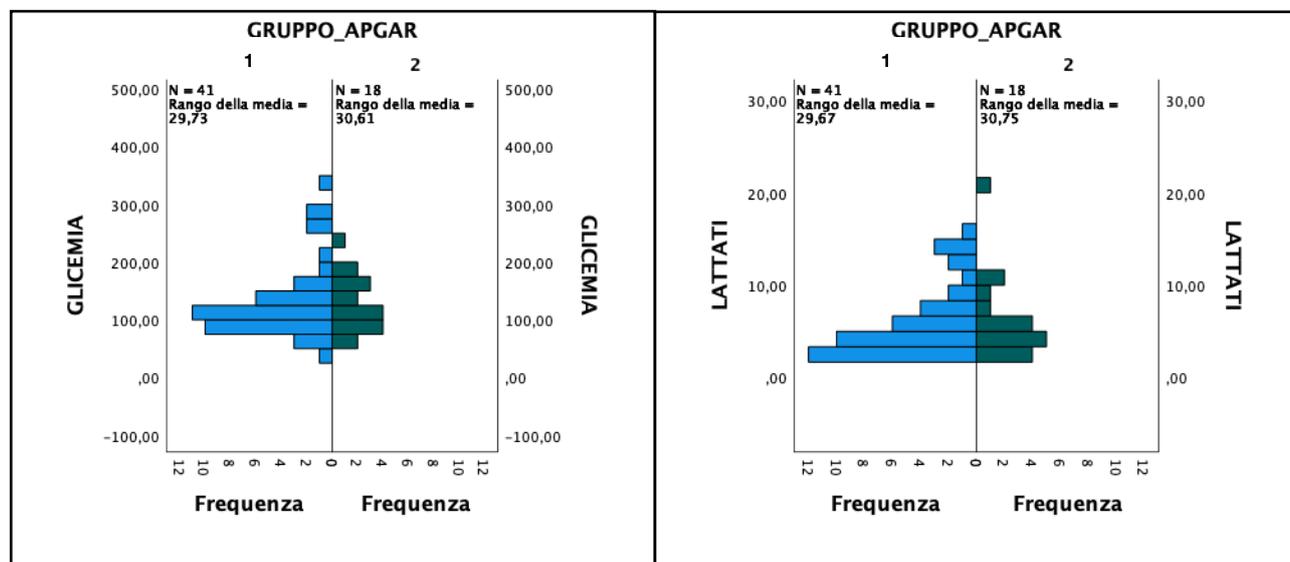


FIGURA 50: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELLA GLICEMIA E DEI LATTATI ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6.

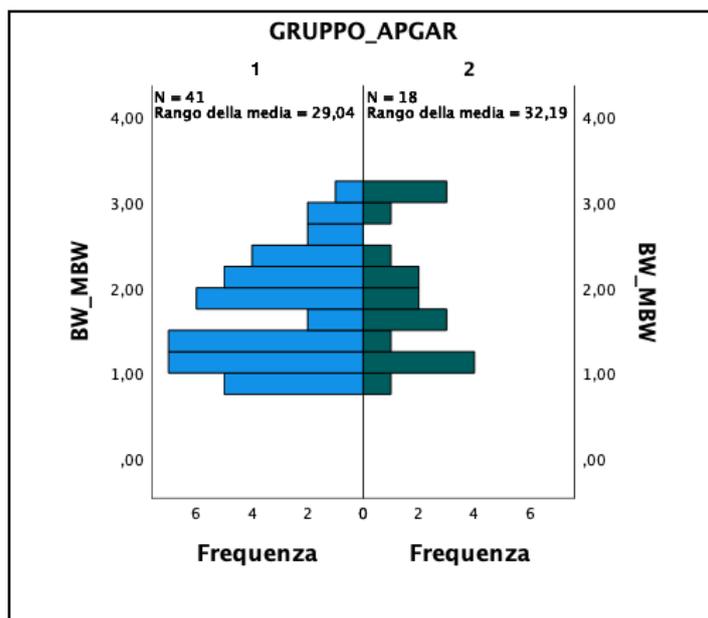


FIGURA 51: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELL'INDICI DI RAPPORTO (TRA IL PESO DEL NEONATO E IL PESO DELLA MADRE (BW/MBW) ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 .

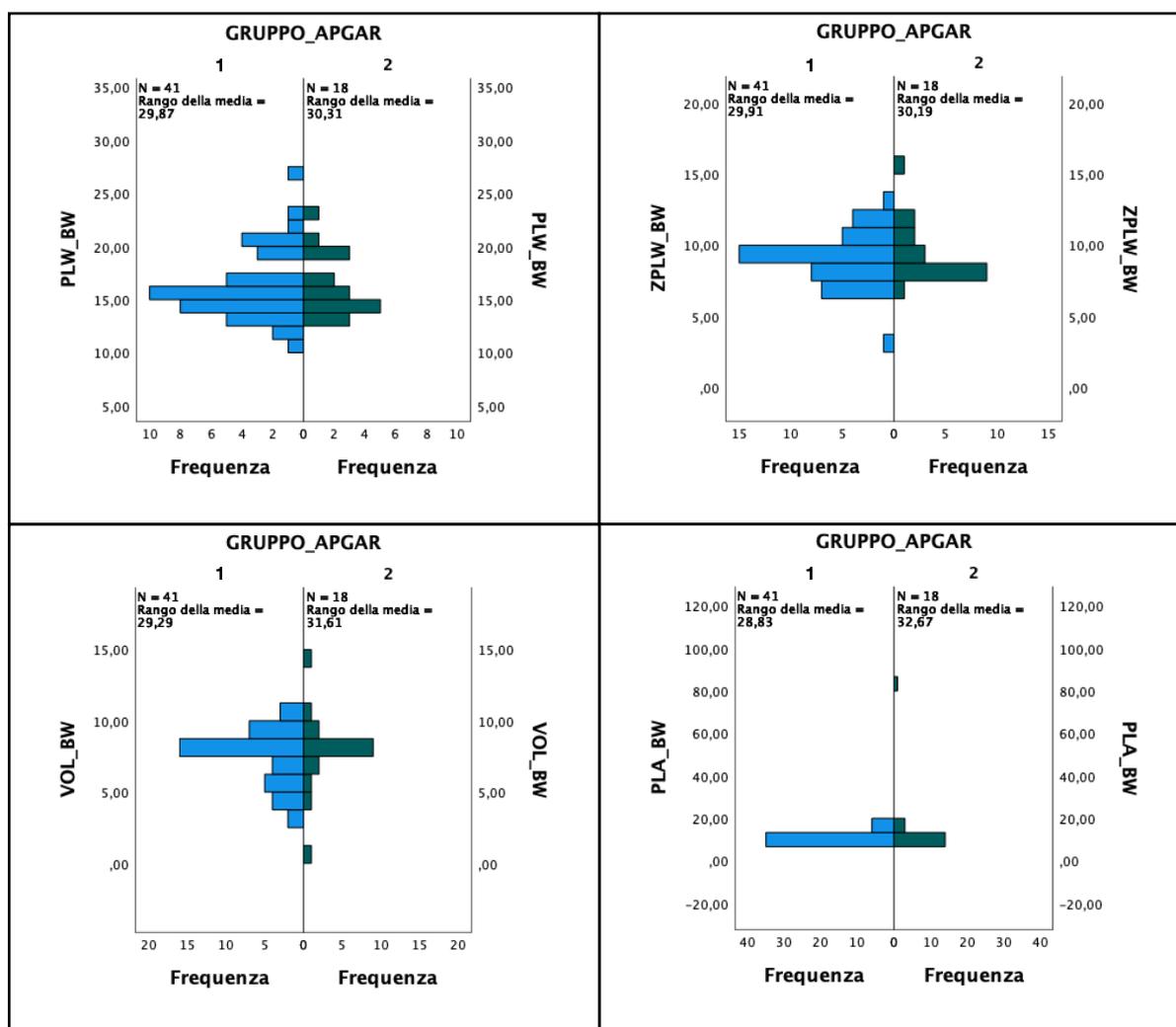


FIGURA 52: DISTRIBUZIONE DEI PARAMETRI MACROSCOPICI DELLA PLACENTA ESPRESI COME INDICI DI RAPPORTO CON IL PESO DEL NEONATO (PLW_BW: PESO DELLA PLACENTA, ZPLW_BW: PESO DELLA PARTE ZONATA, PLA_BW: AREA DELLA PARTE ZONATA, VOL_BW: VOLUME PARTE ZONATA) ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 .

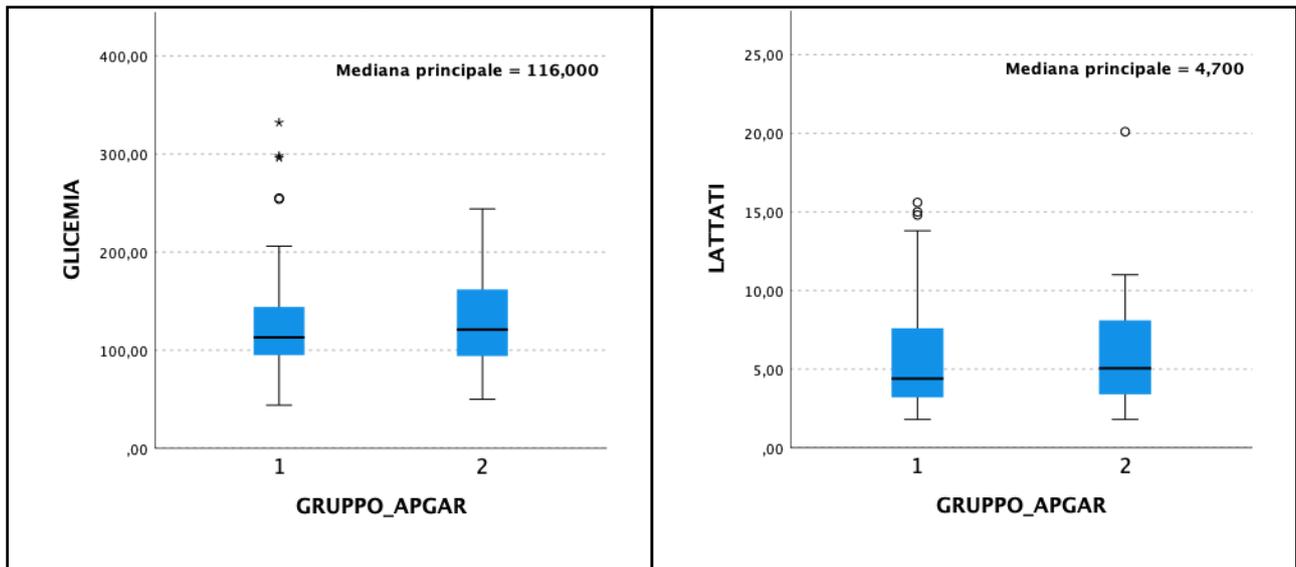


FIGURA 53: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI EMATICI (GLICEMIA E LATTATEMIA) IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

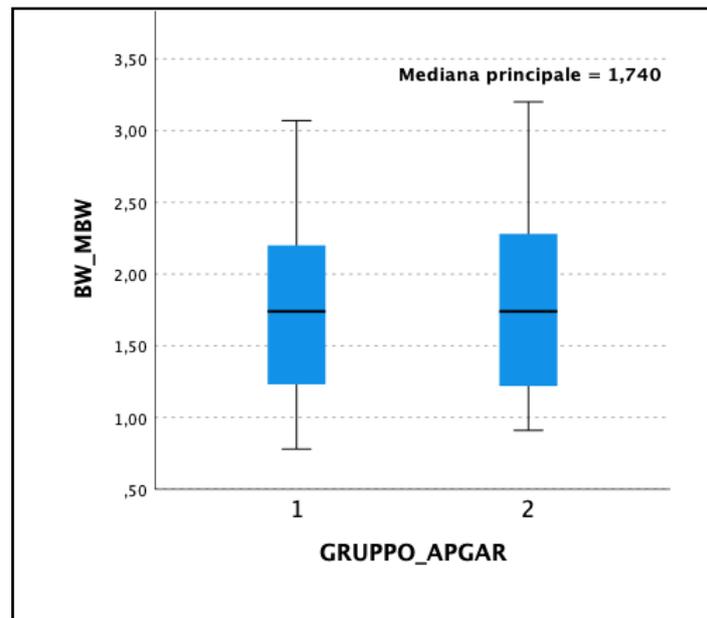


FIGURA 54: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE DI RAPPORTO DEL PESO DEL NEONATO CON IL PESO DELLA MADRE (BW_MBW) IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

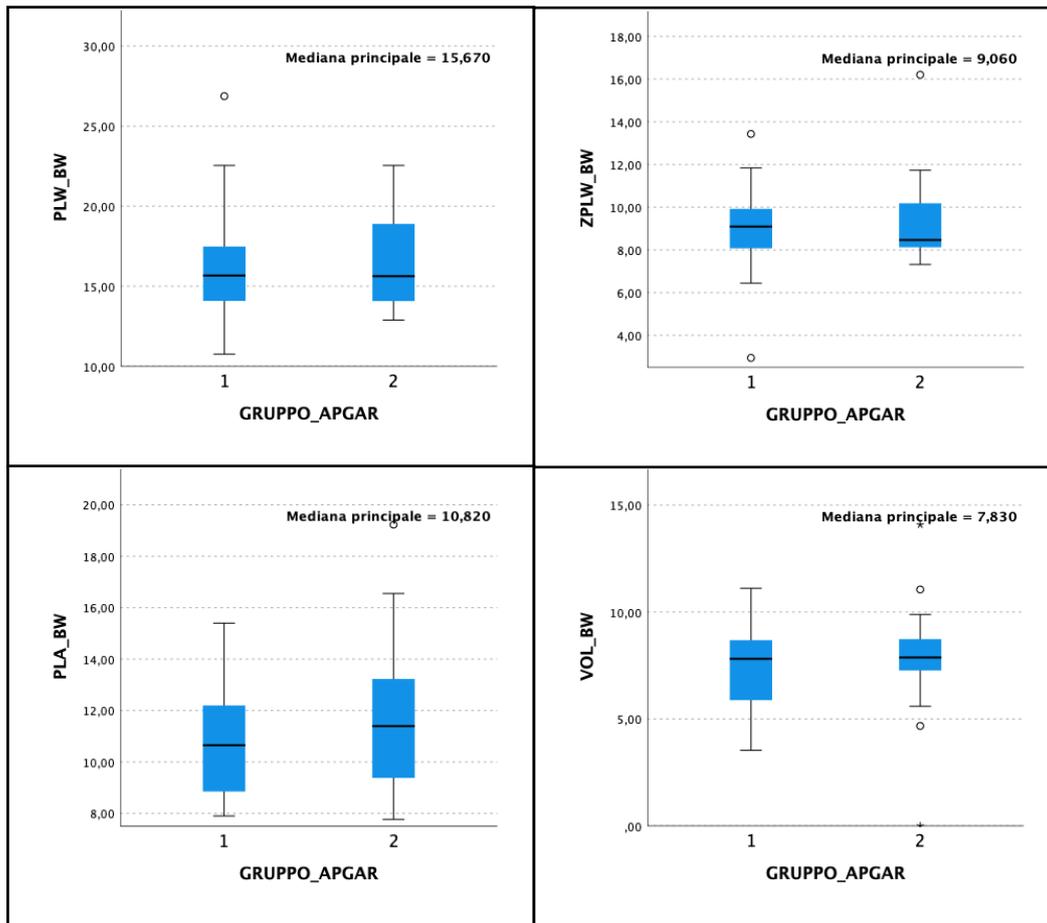


FIGURA 55: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI MACROSCOPICI DELLA PLACENTA ESPRESI COME INDICI DI RAPPORTO CON IL PESO DEL NEONATO (PLW_BW: PESO DELLA PLACENTA, ZPLW_BW: PESO DELLA PARTE ZONATA, PLA_BW: AREA DELLA PARTE ZONATA, VOL_BW: VOLUME PARTE ZONATA) IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Studio statistico 7

Su un numero ridotto di campioni (59) si è andato a ripetere lo studio statistico 3, dove i neonati sono stati divisi in 3 gruppi di criticità così come descritto da Veronesi et al. [12]:

- Gruppo 1: neonati non critici che presentano un APGAR score ≥ 7 ;
- Gruppo 2: neonati moderatamente critici che presentano un APGAR score compreso tra 4 e 6;
- Gruppo 3: neonati critici che presentano un APGAR score ≤ 3 .

Le dimensioni dei tre gruppi risultano essere di 41 cuccioli per il Gruppo 1, 11 nel Gruppo 2 e 7 nel Gruppo 3.

Mediante l'utilizzo del test statistico non parametrico di Kruskal-Wallis, con livello di significatività pari a $p\text{-value} > 0,05$, si è studiata l'eventuale presenza di una relazione tra i gruppi con i parametri ematici del neonato (glicemia e lattatemia alla nascita), dati clinici (BW/MBW) e parametri macroscopici della placenta (VOL/BW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW). Dall'analisi statistica effettuata non si rileva nessuna differenza statisticamente significativa.

In tabella 22 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri all'interno dei tre gruppi.

In figure 56, 57 e 58 sono riportati i grafici scatola e baffi degli parametri considerato nello studio.

Anche in questo caso si è studiata a presenza di una dipendenza dell'indice APGAR dai parametri materni (età, peso, glicemia al momento del parto e parità), dalla dimensione della cucciolata (intesa come grande, normale o piccola secondo lo studio di Borges et al.[118]), dal tipo di parto, dal sesso del neonato, dalla presentazione fetale (cefalico o podalico) e dal posizionamento del feto in utero (corno di destra o sinistra). Dall'analisi si evince che l'indice APGAR non è influenzato da nessuno dei parametri sopra descritti.

TABELLA 22: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici APGAR \geq 7	Glicemia [mg/dl]	133, 63 \pm 67,68	113 (49)	44 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	6,06 \pm 3,97	4,4 (4,4)	1,8 - 15,6
	BW/MBW [%]	1,72 \pm 0,61	1,74 (0,96)	0,78 - 3,07
	PLW/BW [%]	16,29 \pm 3,26	15,66 (3,39)	10,76 - 26,86
	ZPLW/BW [%]	9,07 \pm 1,89	8,44 (1,84)	2,94 - 13,43
	PLA/BW [%]	10,78 \pm 2,04	10,65 (3,35)	7,89 - 15,4
	VOL/BW [%]	7,42 \pm 1,94	7,8 (2,79)	3,52 - 11,11
Gruppo 2: neonati critici APGAR 4 - 6	Glicemia [mg/dl]	127,9 \pm 38,19	123 (58)	76 - 185
	Lattatemia [mmol/L]	4,82 \pm 2,28	5,4 (6,5)	1,8 - 15,6
	BW/MBW [%]	1,66 \pm 0,63	1,7 (1,01)	0,9 - 2,85
	PLW/BW [%]	15,8 \pm 2,33	15,25 (5,28)	12,88 - 20,97
	ZPLW/BW [%]	8,69 \pm 0,86	8,44 (1,07)	7,31 - 10,18
	PLA/BW [%]	17,09 \pm 22,07	11,09 (2,62)	7,76 - 83,45
	VOL/BW [%]	7,03 \pm 2,6	7,83 (0,59)	0 - 9
Gruppo 3: neonati critici APGAR \leq 3	Glicemia [mg/dl]	123, 71 \pm 67,33	118 (77)	50 - 244
	Lattatemia [mmol/L]	8,45 \pm 6,06	5,4 (6,5)	2,9 - 20,1
	BW/MBW [%]	2,27 \pm 0,77	1,87 (1,37)	1,43 - 3,19
	PLW/BW [%]	17,09 \pm 3,55	17,44 (5,28)	12,88 - 22,53
	ZPLW/BW [%]	10,64 \pm 3,04	11,11 (3,54)	7,55 - 16,19
	PLA/BW [%]	13,17 \pm 4,08	12,96 (6,33)	8,44 - 19,22
	VOL/BW [%]	8,95 \pm 2,92	7,91 (3,36)	5,58 - 14,08

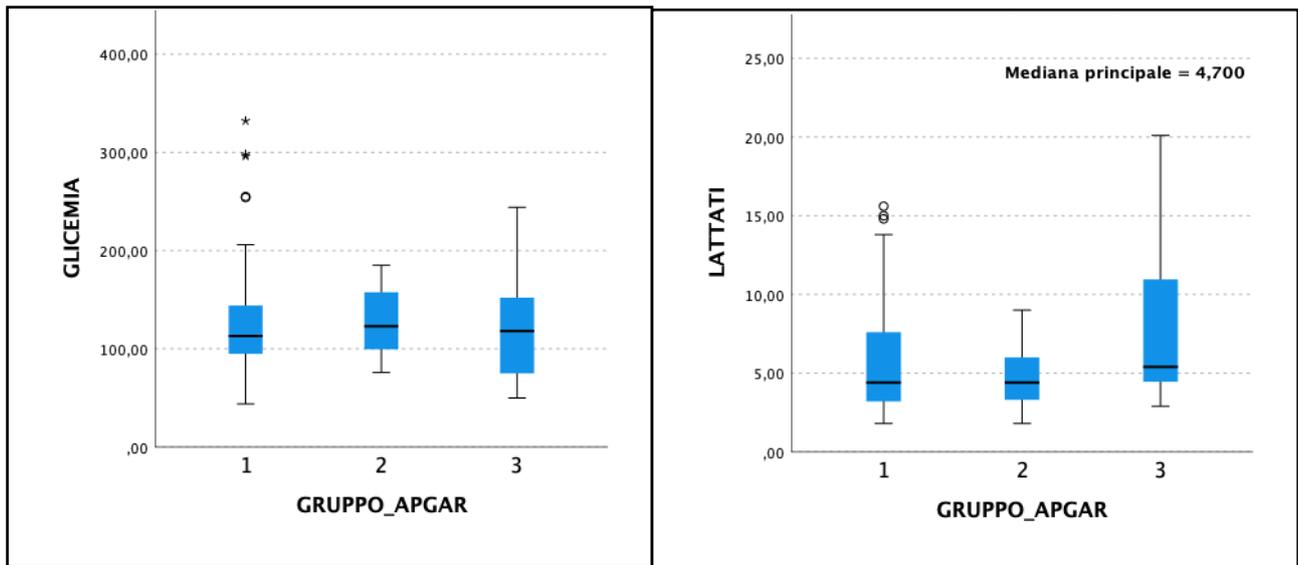


FIGURA 56: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI EMATICI (GLICEMIA E LATTATEMIA) IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI DEBOLMENTE CRITICI CON APGAR COMPRESO TRA 4 E 6, GRUPPO 3 CRITICI CON APGAR ≤ 3 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

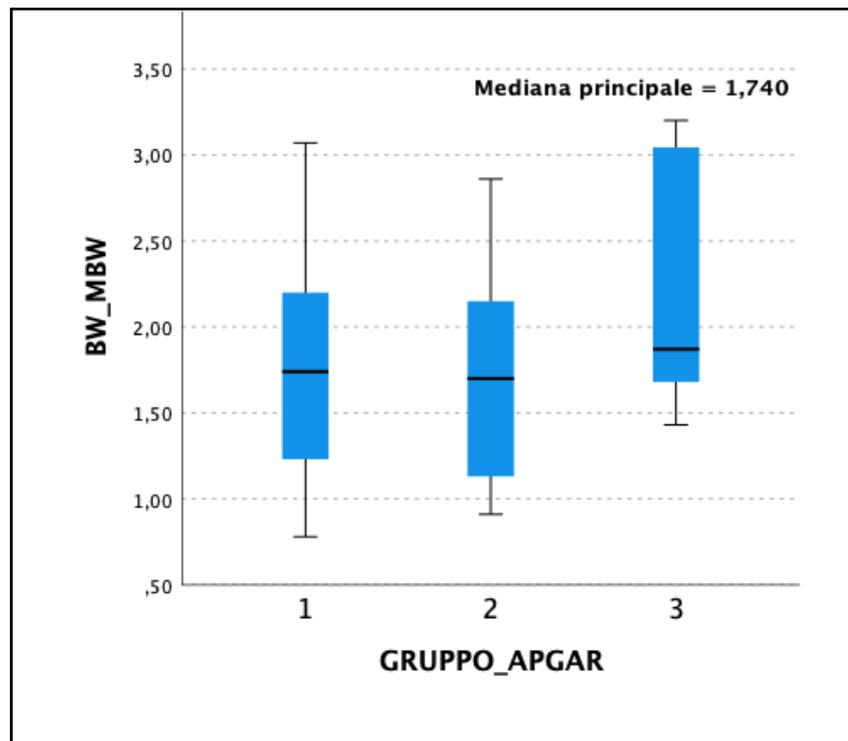


FIGURA 57: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE DI RAPPORTO DEL PESO DEL NEONATO CON IL PESO DELLA MADRE (BW_MBW) IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI DEBOLMENTE CRITICI CON APGAR COMPRESO TRA 4 E 6, GRUPPO 3 CRITICI CON APGAR ≤ 3 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

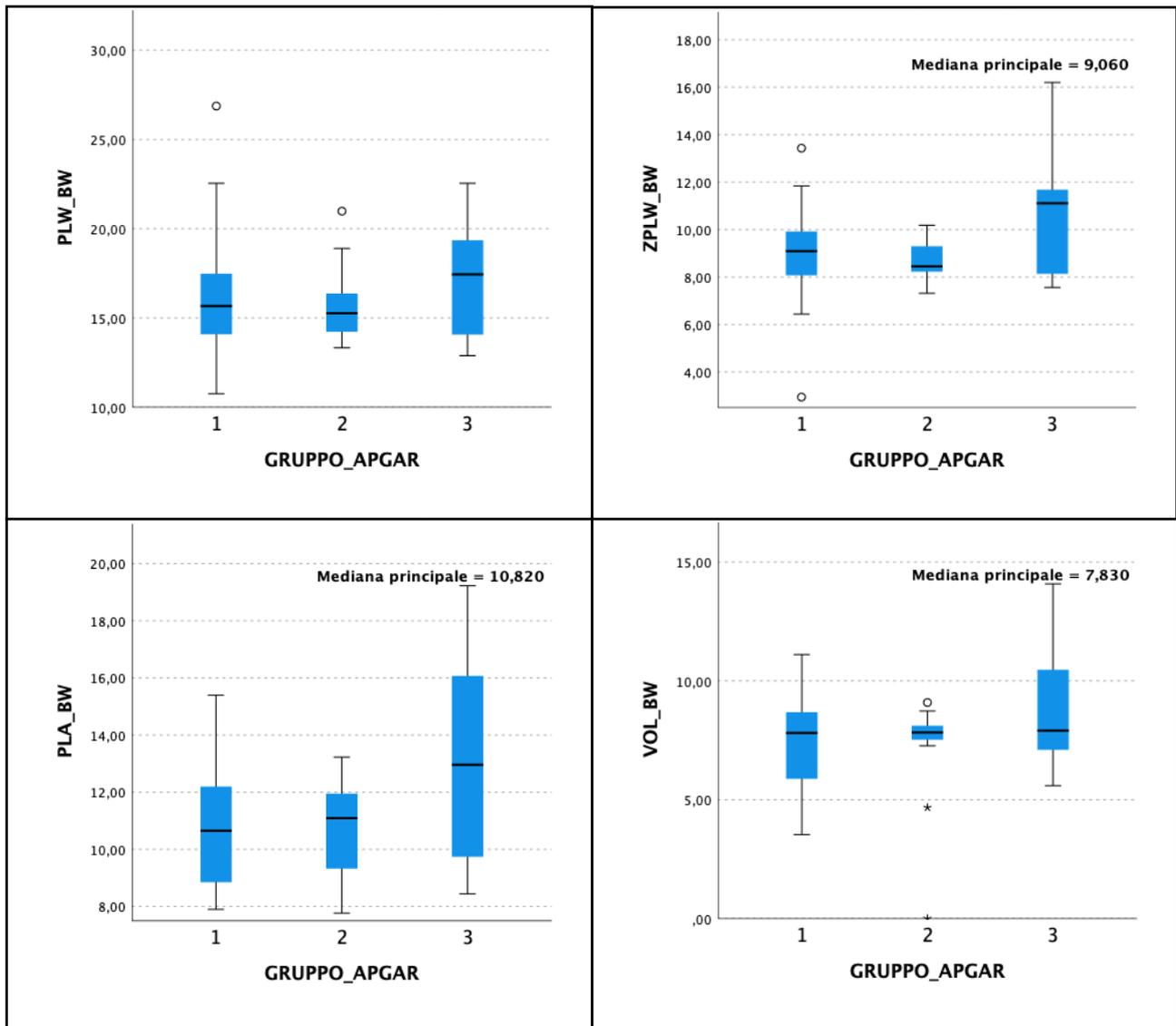


FIGURA 58: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DEI PARAMETRI MACROSCOPICI DELLA PLACENTA ESPRESI COME INDICI DI RAPPORTO CON IL PESO DEL NEONATO (PLW_BW: PESO DELLA PLACENTA, ZPLW_BW: PESO DELLA PARTE ZONATA, PLA_BW: AREA DELLA PARTE ZONATA, VOL_BW: VOLUME PARTE ZONATA) IN FUNZIONE DEI TRE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI DEBOLMENTE CRITICI CON APGAR COMPRESO TRA 4 E 6, GRUPPO 3 CRITICI CON APGAR ≤ 3 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUANTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Studio statistico 8

Considerando solo i neonati appartenenti alla taglia media (peso compreso tra >10 e 25 Kg), si ottiene una popolazione complessiva di 71 neonati che viene divisa in due gruppi, così come descritto per lo studio statistico 2, in funzione dell'indice APGAR:

- Gruppo 1: neonati non critici, con APGAR score ≥ 7 (dimensione del campione 50);
- Gruppo 2: neonati critici, con APGAR score ≤ 6 (dimensione del campione 21).

Successivamente si analizza la presenza di un eventuale relazione tra i due gruppi con i parametri ematici del neonato (glicemia e lattatemia alla nascita), i suoi dati clinici (BW/MBW) e i parametri macroscopici della placenta (PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW).

In tabella 23 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri considerati all'interno dei due gruppi.

Nelle figure 59 e 60 sono riportati rispettivamente i grafici di distribuzione dei parametri considerati messi a confronto tra i due gruppi e il grafico a scatola e baffi degli stessi.

TABELLA 23: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici APGAR ≥ 7 Dimensione campione: 50	Glicemia [mg/dl]	101,44 \pm 34,3	101 (42,25)	35 - 201
	Lattatemia [mmol/L]	4,29 \pm 2,8	3,35 (1,85)	1,8 - 16,5
	BW/MBW [%]	2 \pm 0,51	2 (0,7)	1,01 - 3,5
	PLW/BW [%]	16,04 \pm 3,42	15,48 (2,78)	10,47 - 26,87
	ZPLW/BW [%]	8,79 \pm 1,89	9,05 (1,87)	2,94 - 15
	PLA/BW [%]	11,29 \pm 2,05	11,02 (2,33)	6,39 - 16,33
Gruppo 2: neonati critici APGAR ≤ 6 Dimensione campione: 21	Glicemia [mg/dl]	139,9 \pm 48,75	128 (60)	50 - 244
	Lattatemia [mmol/L]	6,73 \pm 4,07	5,89 (4,30)	1,8 - 20,1
	BW/MBW [%]	1,87 \pm 0,47	1,73 (0,49)	1,02 - 2,86
	PLW/BW [%]	16,21 \pm 2,8	15,38 (3,22)	12,86 - 21,35
	ZPLW/BW [%]	8,84 \pm 1,05	8,63 (0,94)	7,29 - 11,11
	PLA/BW [%]	14,97 \pm 15,83	11,58 (2,42)	8,44 - 83,45

Dall'analisi dei dati eseguita attraverso il test statistico di Mann-Whitney per variabili non parametriche tra i due gruppi risulta esserci una differenza statisticamente significativa tra i valori della glicemia e dei lattati misurati alla nascita. Mentre per quanto riguarda l'indice di rapporto del peso del neonato e i parametri macroscopici della placenta (PLW/BW, ZPLW/BW e PLA/BW) non risulta esserci nessuna differenza statisticamente significativa.

In particolare si evince che cuccioli non critici appartenenti al gruppo 1 presentano valori lattatemici minori rispetto ai cuccioli classificati critici, mentre per quanto riguarda la glicemia, nonostante i cuccioli all'interno di entrambi i gruppi possano essere definiti normoglicemici, presentano un valore glicemico più basso nei neonati non critici rispetto ai critici.

Anche in questo caso si è studiata la presenza di un effetto madre (età, peso, glicemia e parità), effetto cucciolo (sesso), effetto cucciolata (dimensione della cucciolata), tipo di taglio cesareo eseguito, presentazione fetale e posizionamento a livello uterino del feto. A differenza di quanto emerso dallo studio statistico 2, nei cani di media taglia l'indice APGAR non risulta essere influenzato dai parametri sopra elencati.

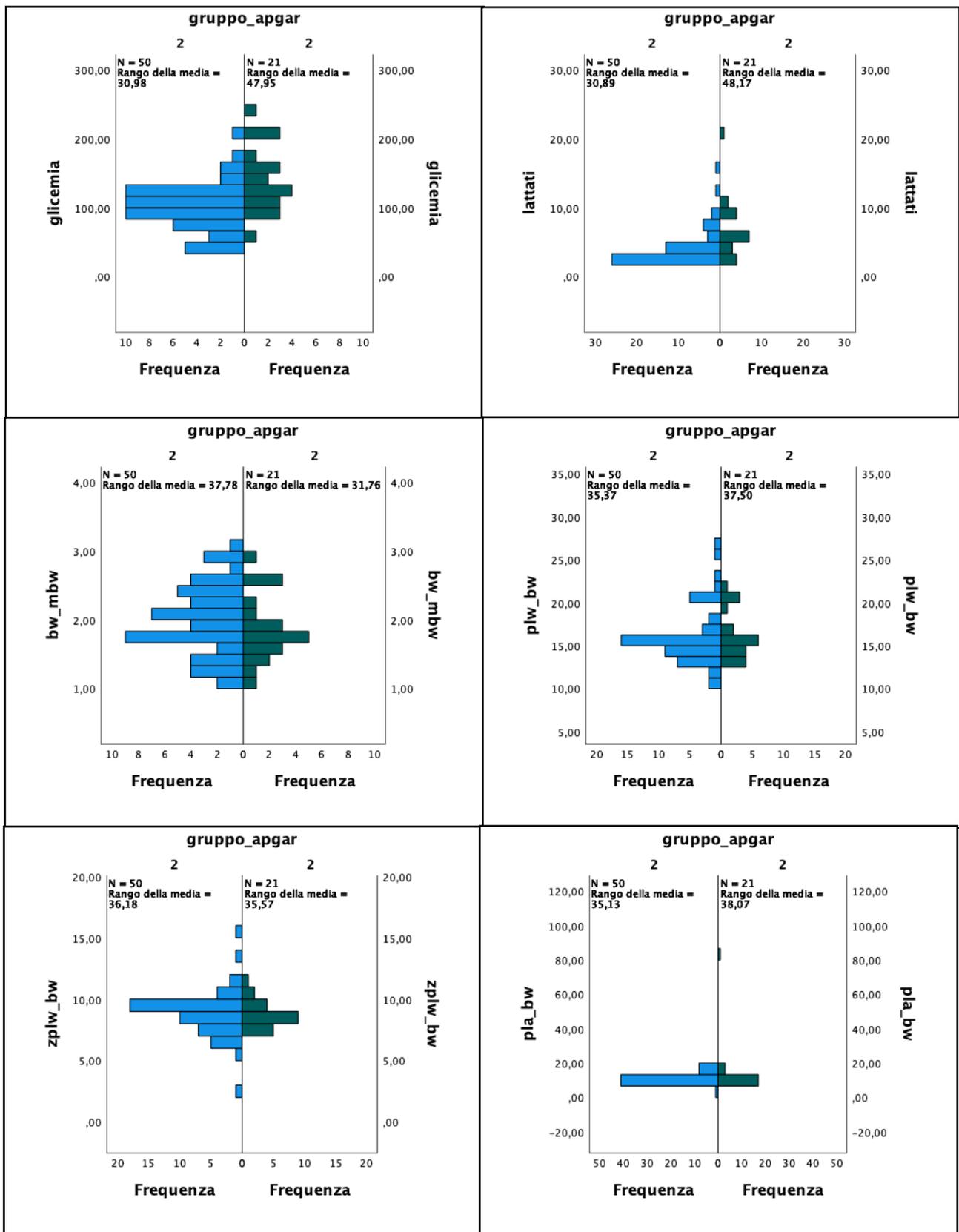


FIGURA 59: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELLA GLICEMIA, DEI LATTATI, E DEGLI INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW E PLA/BW ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6.

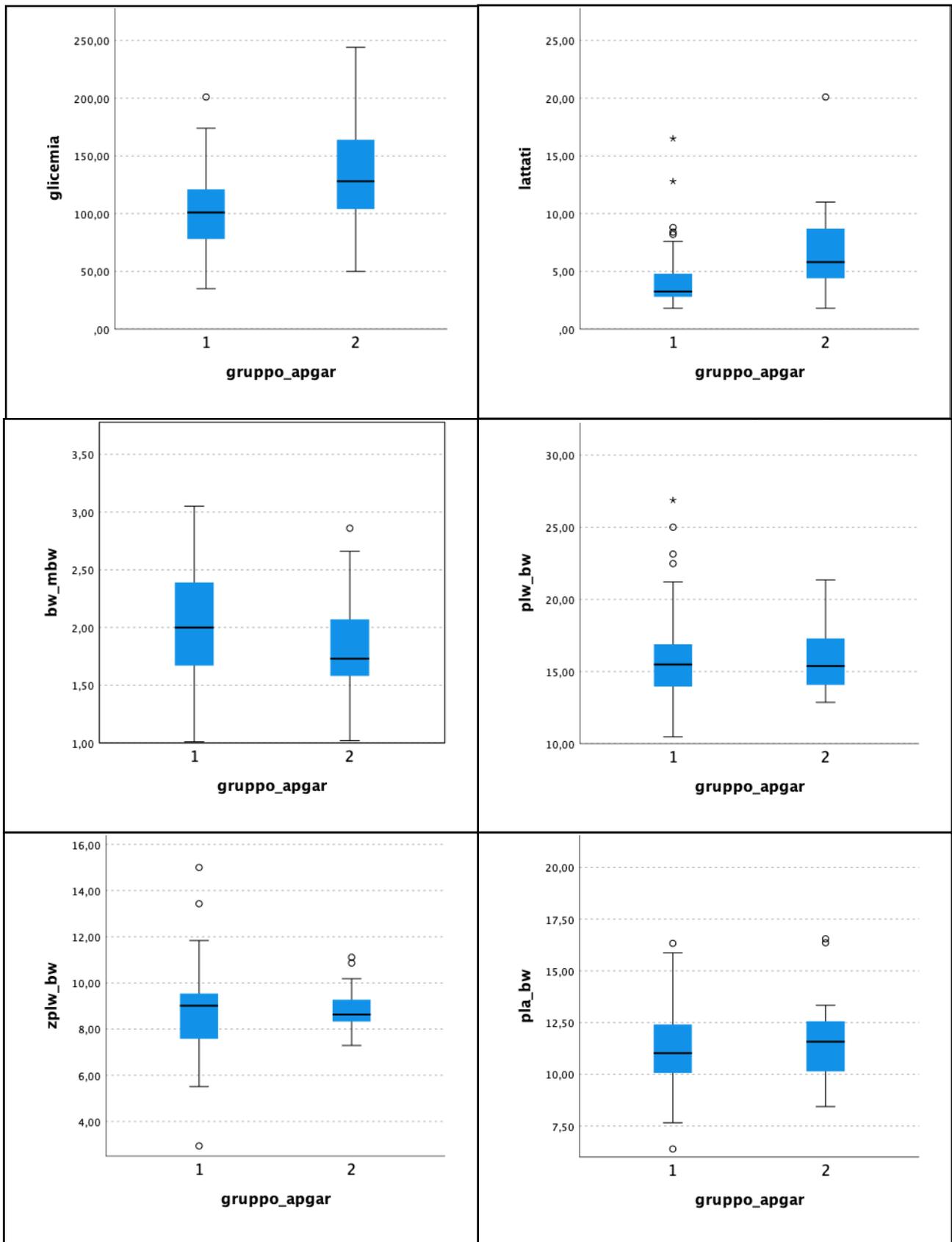


FIGURA 60: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA E INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7, GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6. OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Studio statistico 9

La stessa analisi eseguita nello studio statistico 8 si esegue sui neonati appartenenti alla grande taglia (peso > 25kg), i due gruppi ottenuti in base all'indice APGAR sono:

- Gruppo 1: neonati non critici, con APGAR score ≥ 7 (dimensione del campione 22);
- Gruppo 2: neonati critici, con APGAR score ≤ 6 (dimensione del campione 15).

In tabella 23 sono riportati le medie \pm sd, mediana (IQR) e il *range* dei parametri all'interno dei due gruppi.

TABELLA 23: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: neonati non critici APGAR ≥ 7 Dimensione campione: 50	Glicemia [mg/dl]	147,54 \pm 84,86	106 (98,5)	60 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	7,51 \pm 4,30	5,9 (6,65)	2,7 - 15,6
	BW/MBW [%]	1,3 \pm 0,51	1,14 (0,46)	0,78 - 2,27
	PLW/BW [%]	16,87 \pm 2,94	16,02 (3,94)	12,25 - 22,54
	ZPLW/BW [%]	9,56 \pm 1,63	9,69 (2,65)	6,44 - 11,83
	PLA/BW [%]	10,56 \pm 2,16	10,07 (3,46)	7,92 - 15,92
Gruppo 2: neonati critici APGAR ≤ 6 Dimensione campione: 21	Glicemia [mg/dl]	83,4 \pm 29,86	75 (9,5)	55 - 151
	Lattatemia [mmol/L]	5,68 \pm 2,30	5,2 (2,75)	3 - 11,8
	BW/MBW [%]	1,19 \pm 0,26	1,11 (0,18)	0,91 - 1,75
	PLW/BW [%]	15,09 \pm 3,26	14,32 (3,259)	11,47 - 23,80
	ZPLW/BW [%]	8,82 \pm 1,21	8,68 (2,65)	6,44 - 11,83
	PLA/BW [%]	11,02 \pm 2,28	10,58 (2,99)	7,77 - 14,89

Dall'analisi dei dati, eseguita mediante il test statistico non parametrico di Mann-Whitney, è emerso che l'unico parametro dove è presente una differenza statisticamente significativa è la glicemia. In questo studio statistico si evince che neonati non critici alla nascita (gruppo 1) risultano avere valori di glicemia maggiori rispetto a neonati critici.

Nelle figure 61 e 62 sono riportati rispettivamente i grafici di distribuzione dei parametri considerati messi a confronto tra i due gruppi e il grafico a scatola e baffi degli stessi.

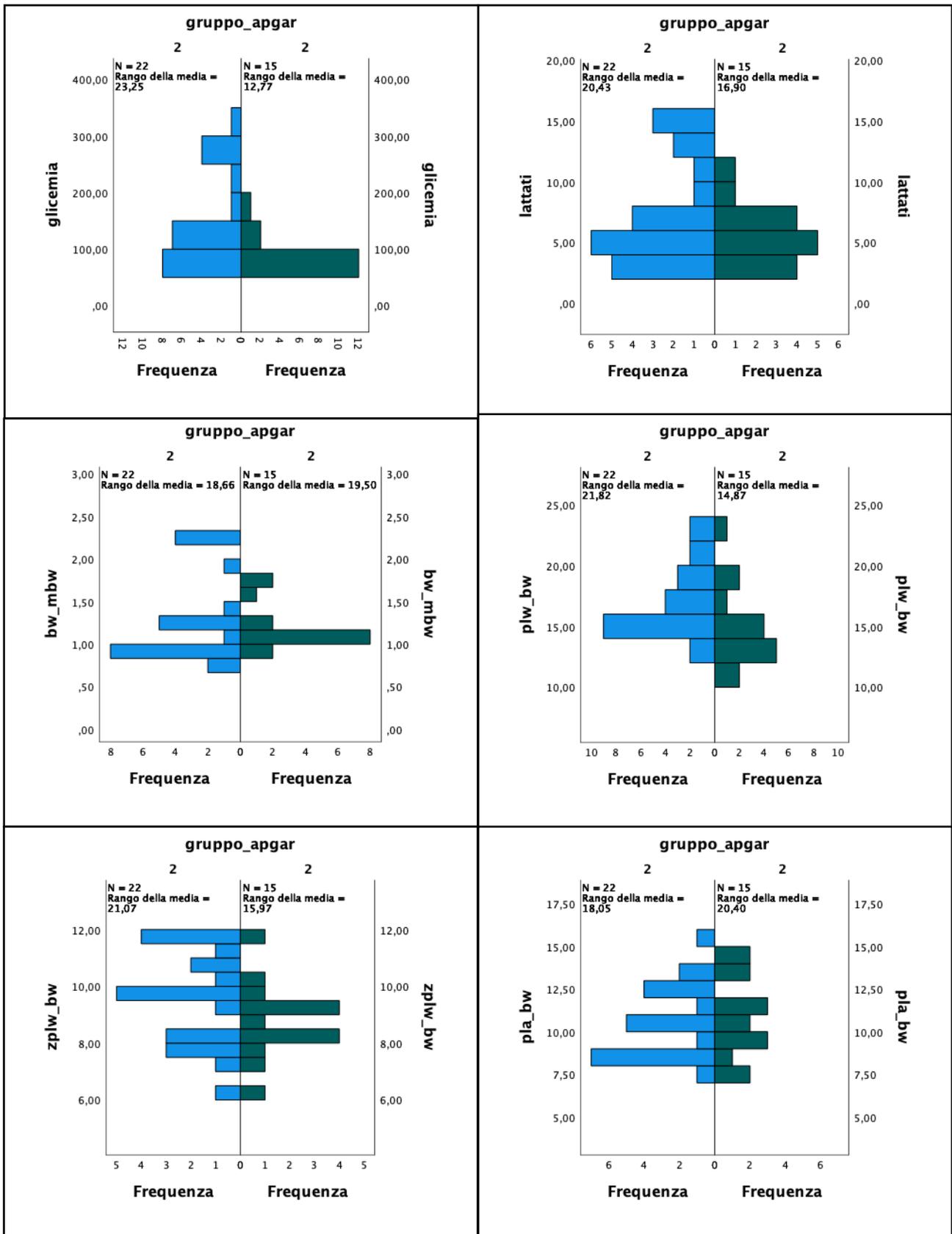


FIGURA 61: DISTRIBUZIONE DELLA FREQUENZA DELLA GLICEMIA, DEI LATTATI, E DEGLI INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW E PLA/BW ALL'INTERNO DEI DUE GRUPPI: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 .

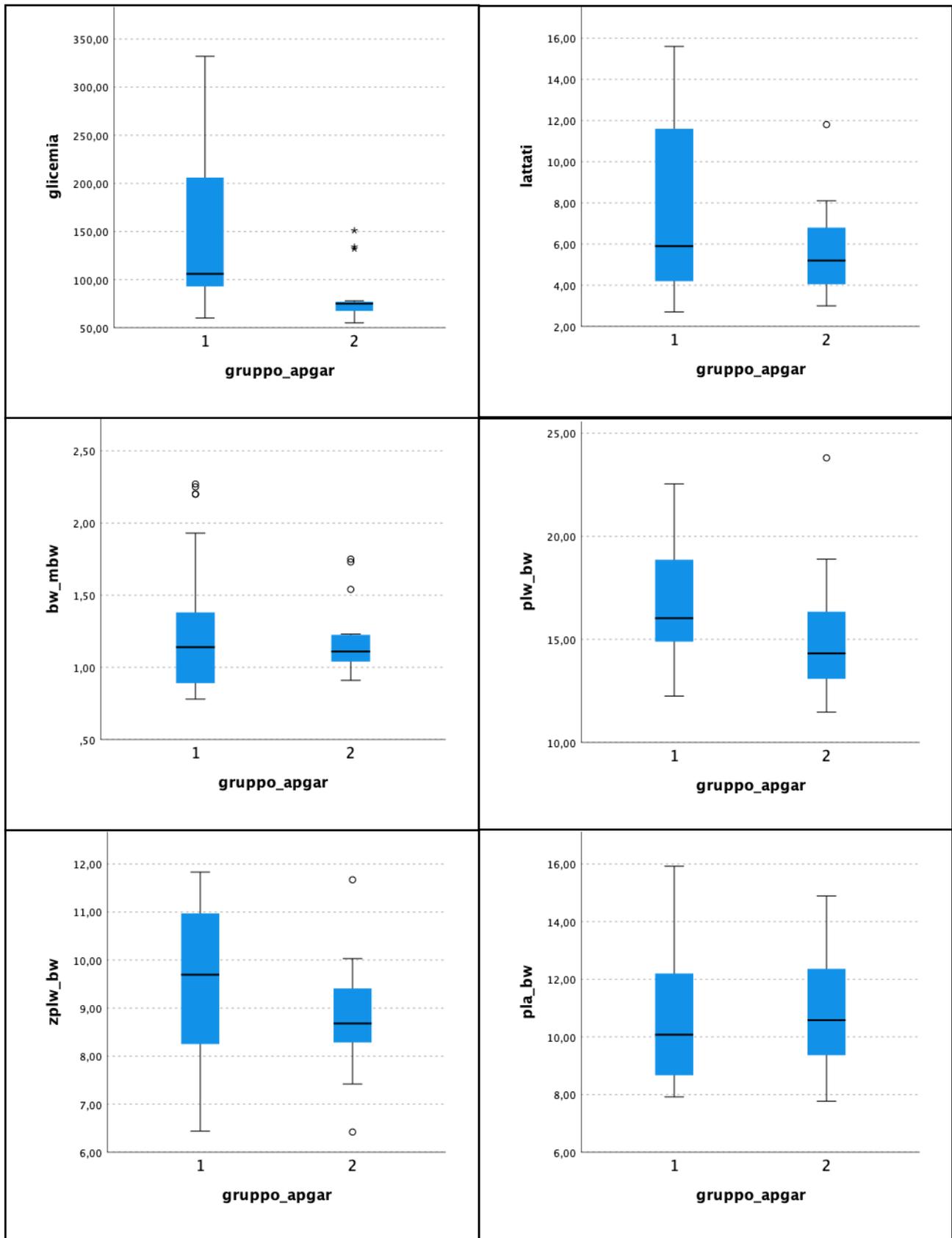


FIGURA 62: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA E INDICI DI RAPPORTO BW/MBW, PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEI DUE GRUPPI DI APPARTENENZA: GRUPPO 1 NEONATI NON CRITICI CON APGAR ≥ 7 , GRUPPO 2 NEONATI CRITICI CON APGAR ≤ 6 . OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Anche in questo caso si è studiato l'effetto madre (età, peso, glicemia e parità), l'effetto cucciolo (sesso), l'effetto cucciolata (dimensione della cucciolata), l'influenza del tipo di taglio cesareo eseguito, della presentazione fetale e del posizionamento a livello uterino del feto (corno destro o sinistro). Dai risultati ottenuti si osserva che in questo studio statistico l'APGAR score sembra essere influenzato da alcuni parametri materni e dal tipo di taglio cesareo:

- è presente una correlazione positiva con la sola età della madre, ovvero all'aumentare dell'età aumenta il valore dell'APGAR score;
- l'APGAR score dei neonati risulta minore in corso di taglio cesareo d'urgenza rispetto al programmato (in tabella 24 è riportata la tavola di contingenza).

TABELLA 24: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA AL TIPO DI TAGLIO CESAREO ESEGUITO.

	Gruppo 1: no critici APGAR \geq 7	Gruppo 2: critici APGAR \leq 6	Totale
Taglio cesareo programmato	3	7	10
Taglio cesareo d'urgenza	19	8	27
Totale	22	15	37

Studio statistico 10

In base allo studio statistico 1 che ha permesso di individuare, indifferentemente dalla taglia e razza del neonato, il rapporto BW/MBW che un neonato deve avere alla nascita al fine di essere definito normo-peso, in base alla nostra popolazione di studio, si è provveduto a dividere i 123 neonati in 3 gruppi così definiti:

- Gruppo 0: neonati normo-peso, con un peso alla nascita pari al 0,9 - 2,74% del peso materno;
- Gruppo 1: neonati sottopeso, con un peso alla nascita inferiore al 0,9% del peso materno;
- Gruppo 2: neonati sovrappeso, con un peso alla nascita superiore a 2,74% del peso materno.

In tabella 25 sono riportati i valori espressi come medie \pm sd, mediane (IQR) e *range* dei parametri considerati all'interno dei tre gruppi.

Attraverso l'utilizzo del test statistico non parametrico di Kruskal-Wallis, in quanto i dati risultano non parametrici per il test di normalità di Shapiro-Wilks, si è analizzata la relazione esistente tra i tre gruppi con l'APGAR score, la glicemia, la lattatemia, e i parametri macro- e microscopici della placenta ed è emerso che il BW/MBW presenta una differenza statisticamente significativa con ZPLW/BW e l'indice APGAR ma non con gli altri parametri considerati. In particolare si ha che:

- l'indice di rapporto ZPLW/BW in neonati sottopeso risulta essere maggiore rispetto a quelli che presentano un indice di rapporto normale o a neonati sovrappeso, ovvero il peso della parte zonata è maggiore;
- l'indice APGAR risulta essere inferiore in neonati sovrappeso.

In figura 63 sono riportate i grafici a scatola e baffi dei parametri analizzati in relazione al gruppo di appartenenza.

TABELLA 25: MEDIE \pm SD, MEDIANA (IQR) E IL RANGE DEI PARAMETRI ALL'INTERNO DEL GRUPPO DI APPARTENENZA

	Parametro	Media \pm sd	Mediana (IQR)	Range
Gruppo 1: BW/MBW = 0,9-2,74% peso normale	APGAR	7,29 \pm 2,59	8 (4)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	119,08 \pm 57,51	110 (59)	35 - 332
	Lattatemia [mmol/L]	5,54 \pm 3,37	4,35 (3,75)	1,8 - 20,1
	PLW/BW	16,24 \pm 3,19	15,35 (3,42)	10,76 - 22,53
	ZPLW/BW	8,9 \pm 1,6	8,97 (1,68)	2,94 - 16,19
	PLA/BW	11,92 \pm 7,61	10,9 (2,72)	6,39 - 83,45
Gruppo 2: BW/MBW < 0,9% sottopeso	APGAR	9,5 \pm 0,83	10 (0,75)	8 - 10
	Glicemia [mg/dl]	90 \pm 20,19	99,5 (27,75)	60 - 107
	Lattatemia [mmol/L]	7,23 \pm 4,66	6 (4,47)	3,1 - 15,6
	PLW/BW	18,24 \pm 3,49	18,20 (2,54)	12,25 - 22,53
	ZPLW/BW	10,73 \pm 1,64	11,27 (0,89)	7,5 - 11,83
	PLA/BW	12,13 \pm 2,5	12,31 (2,62)	8,83 - 15,91
Gruppo 3: BW/MBW > 2,74% sovrappeso	APGAR	6,10 \pm 3,26	7 (5)	0 - 10
	Glicemia [mg/dl]	97,05 \pm 40,86	90 (53)	47 - 196
	Lattatemia [mmol/L]	4,25 \pm 1,29	4 (1,75)	2,8 - 7,6
	PLW/BW	16,06 \pm 2,92	16 (3,62)	10,46 - 22,53
	ZPLW/BW	9,95 \pm 2,58	9,09 (2,93)	6,88 - 16,19
	PLA/BW	13,29 \pm 3,42	12,18 (5,82)	7,89 - 19,22

Si è infine valutato l'effetto madre, l'effetto cucciolata, l'eventuale influenza da parte della taglia, tipo di taglio cesareo eseguito, presentazione fetale, posizionamento del feto in utero (corno destro o sinistro) e dalla presenza di alterazioni microscopiche a livello placentare (intese come presenza o assenza di necrosi) attraverso l'indice di correlazione di Pearson per le variabili numeriche ed attraverso il test del Chi-Quadrato per le variabili qualitative. Dall'analisi eseguita si evince che:

- è presente un effetto madre, ovvero BW/MBW si abbassa all'aumentare dell'età, del peso e della parità
- il rapporto BW/MBW dipende dalla taglia, in particolare si è osservato che cani di piccola taglia presentano un BW/MBW maggiore (sovrappeso), mentre quelli di media e

grande taglia è più probabile che presentino un peso normale alla nascita (vedi tabella 26).

- infine il rapporto BW/MBW sembra essere influenzata dalla dimensione della cucciolata, dove si evince, analizzando la tavola di contingenza (tabella 27), che all'aumentare delle dimensioni della cucciolata aumentano il numero dei cuccioli che presentano una percentuale di peso corporeo rispetto al peso della madre inferiore al 0,9%.

TABELLA 26: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA ALLA TAGLI DI APPARENZA DEL NEONATO

	Gruppo 1: normopeso	Gruppo 2: sottopeso	Gruppo 2: sovrappeso	Totale
Piccola taglia < 10 kg	2	0	13	15
Media taglia 11-25 Kg	65	0	6	71
Grande taglia > 26 Kg	31	6	0	37
Totale	98	6	19	123

TABELLA 27: TAVOLA DI CONTINGENZA RELATIVA ALLA DIMENSIONE DELLA CUCCIOLATA STABILITO SECONDO IL LAVORO DI BORGES ET AL. [118]

	Gruppo 1: normopeso	Gruppo 2: sottopeso	Gruppo 2: sovrappeso	Totale
Dimensione cucciolata normale	40	20	38	98
Dimensione cucciolata piccola	3	2	1	6
Dimensione cucciolata grande	0	14	5	19
Totale	43	36	44	123

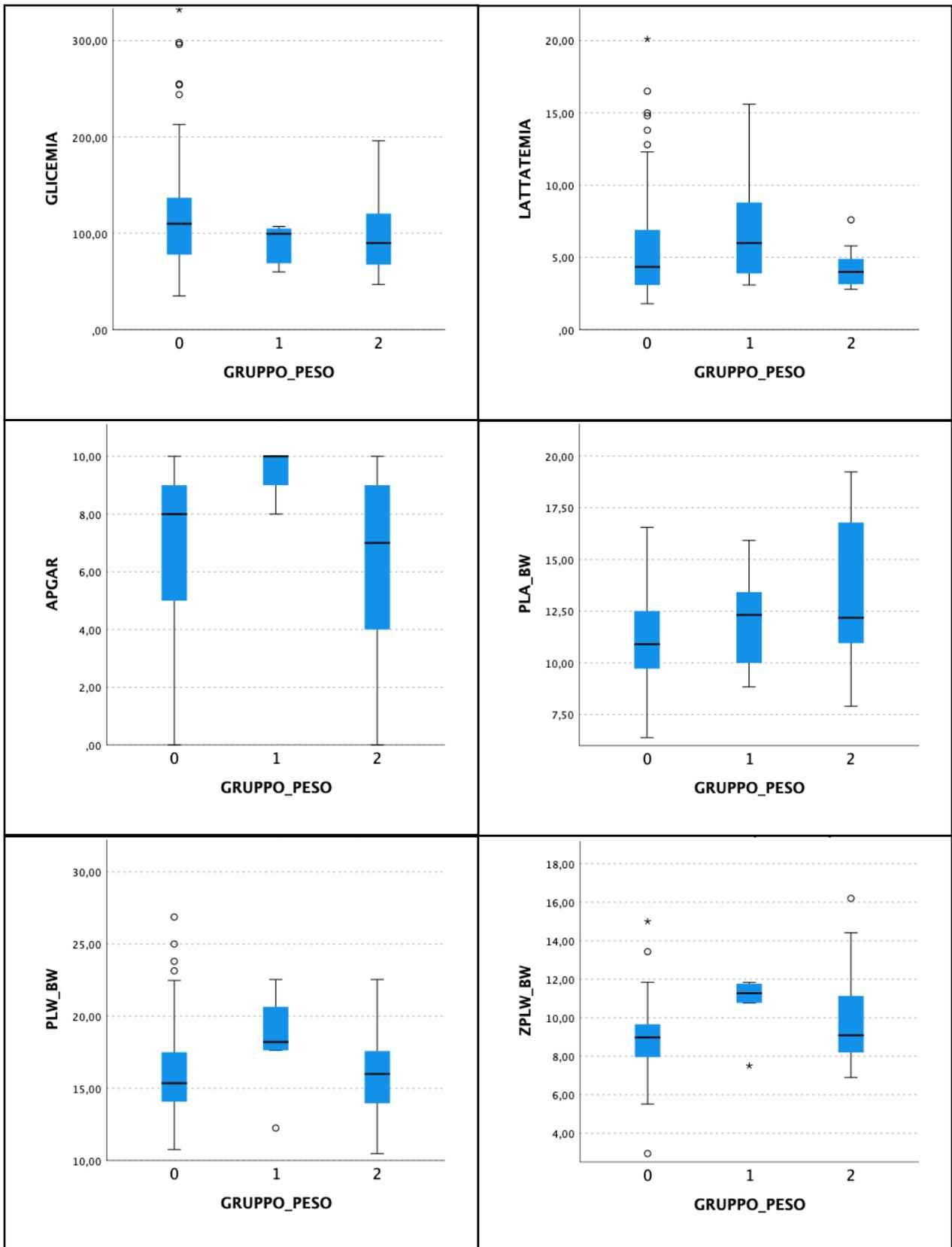


FIGURA 63: GRAFICO A SCATOLA E BAFFI DELL'INDICE APGAR, DELLA GLICEMIA, DELLA LATTATEMIA E INDICI DI RAPPORTO PLW/BW, ZPLW/BW, PLA/BW DIVISI IN FUNZIONE DEL GRUPPO DI APPARTENENZA: GRUPPO 0: NORMOPESO, GRUPPO 1: SOTTOPESO, GRUPPO 2: SOVRAPPESO. OGNI CASELLA RAPPRESENTA DAL PRIMO AL TERZO QUARTILE (25°-75° PERCENTILE), LA BARRA IN OGNI CASELLA RAPPRESENTA LA MEDIANA E I BAFFI RAPPRESENTANO I VALORI ESTREMI.

Discussione

I pazienti neonati sono piccoli e fragili, e il passaggio tra la vita fetale e neonatale è un momento cruciale per un cucciolo caratterizzato da importanti cambiamenti fisiologici e biochimici che coinvolgono tutti gli organi del corpo. Se questi cambiamenti falliscono o non avvengono correttamente possono comportare conseguenze fatali e molto spesso esitano nella morte del neonato [120]. Il tasso di mortalità neonatale nelle prime due settimane di vita si aggira tra il 9% e il 26%, e risulta essere maggiore durante la prima settimana di vita [120], mentre se si considera l'intero periodo neonate, dalla nascita all'inizio dello svezzamento, è compreso tra l'11% e il 13% [1, 2, 4]. Questo alto tasso di mortalità neonatale, nella specie canina, risulta essere un importante fonte di preoccupazione non solo dal punto di vista del benessere dell'animale ma anche da un punto di vista economico per l'allevatore. Per quanto riguarda il nostro studio, il tasso di mortalità registrato risulta essere pari al 21,47% (35 neonati su 163) nelle prime due settimane di vita in accordo con quanto riportato in letteratura [120]. Escludendo dal conto i 22 nati morti, il tasso di mortalità registrato nelle prime due settimane di vita è pari al 13,49%, mentre se consideriamo solo i neonati morti nella prima settimana di vita il tasso è del 4,9%, molto più basso rispetto a quanto riportato in letteratura ma in accordo con i risultati di Tesi et al [59].

Diverse sono le cause di mortalità neonatale e molto spesso risultano essere multifattoriali, tra tutte, le principali descritte in letteratura risultano essere l'ipossia, l'ipotermia e l'ipoglicemia, a volte complicate da patologie infettive [5, 6]. In questo studio, dei 35 morti, il 25,71% sono morti per cause secondarie legate ad un'infezione batterica a carico delle vie respiratorie contratta dalla madre e uno è stata vittima di cannibalismo materno, mentre il 37,14% presentava dei difetti congeniti (anasarca, palatoschisi e spina bifida) e il restante 37,15% è nato morto o morto entro le prime 24 di vita. Pertanto, visto le principali cause di morte neonatale registrate, non è stato possibile eseguire una valutazione adeguata che permettesse di mettere in relazione l'indice APGAR, la lattatemia, la glicemia e il peso del neonato alla nascita con il tasso di mortalità, in quanto il 62,85% dei cuccioli morti è riconducibile a difetti congeniti classificabili come difetti non compatibili con la vita e con cause materne/ambientali indipendenti dai parametri neonatali valutabili alla nascita. Ma

volendo ugualmente avere un'idea di massima si osserva che la maggior parte dei neonati morti presentava un indice APGAR basso ($<$ di 6), una lattatemia media maggiore di 5mmol/L, risultavano tutti normoglicemici (glicemia media di circa 101 mg/dl) e BW/MBW medio del 1,86% (nella norma secondo il presente studio). Pertanto, seppur con i limiti descritti, possiamo osservare che anche nella nostra popolazione, tra tutti i parametri rilevabili alla nascita in un neonato, l'indice APGAR, così come già verificato in precedenti studi [14, 50], e la lattatemia, così come riscontrato da Groppetti et al [13] e Castagnetti et al [15], possono essere parametri utili al fine della pronta identificazione di un neonato critico alla nascita e che quindi possa presentare un maggiore rischio di morte nei primi giorni di vita. Questo dato risulta in disaccordo con quanto trovato da Mila et al [50] dove invece non viene riscontrata nessuna relazione tra la probabilità di morire di un neonato e il valore della lattatemia alla nascita, ma bensì osservano che la mortalità neonatale è legata a valori bassi della glicemia riscontrati nelle prime 24 ore di vita.

Ad oggi un valido sistema di monitoraggio del neonato alla nascita, con lo scopo di identificarne i critici, ovvero quelli che presentano un alto rischio di mortalità nei primi giorni di vita con il fine di fornirgli le adeguate cure, non è ancora stato trovato. Diversi sono i parametri descritti in letteratura che vanno considerati in corso di visita neonatale, e pertanto anche alla nascita, al fine di poter definire un neonato critico oppure no. Tra questi parametri abbiamo l'indice APGAR, la glicemia, la lattatemia e il peso. Di questi però solo l'APGAR score e la concentrazione dei lattati alla nascita, che riflettono il livello di ossigenazione del neonato, sono stati messi in relazione con la mortalità neonatale nelle prime 24-48h di vita [12-15]. Per quanto riguarda l'indice APGAR sappiamo che neonati che presentano un punteggio inferiore a 6 sono soggetti che possono presentare delle difficoltà [14], mentre per i lattati possiamo considerare critici tutti quei neonati che presentano una lattatemia superiore ai 5 mmol/L [13]. Per gli altri due parametri invece, glicemia e peso, purtroppo ad oggi non sono noti dei valori di riferimento. È noto che neonati che presentano un peso inferiore al 25% rispetto al peso medio della cucciolata sono soggetti che più facilmente possono andare in contro a morte in quanto più propensi a sviluppare ipotermia, ad andare incontro ad un esaurimento più rapido dell'energia e quindi più predisposti ad ipoglicemia anche per il fatto che faticano a concorrere per la mammella

[2, 121]. Però a causa della grande differenza morfologica esistente tra le varie taglie e tra le razze appartenenti alla stessa taglia, non è ad oggi noto un valore che ci permetta di stabilire se il neonato è normo-peso oppure no alla nascita. Altrettanto vale per la glicemia, i valori normali di glicemia per pazienti neonati riportati in letteratura sono molto vari, si va dai 88 mg/dl fino ai 133mg/dl [3, 73, 74], ma nessuno di questi si riferisce al valore di glicemia che possiamo trovare in un neonato al momento della nascita prima dell'assunzione di colostro e pertanto non è possibile dire quale sia la corretta concentrazione di glucosio alla nascita.

Per questi motivi in questo studio si è deciso di utilizzare principalmente il punteggio APGAR al fine di definire un neonato critico in quanto, ad oggi, è l'unico sistema valido e riconosciuto, rapido da eseguire ma soprattutto i cui risultati risultano ripetibili nel tempo. Dividendo la popolazione di studio in funzione dell'APGAR score si è andato a valutare se fosse presente una relazione tra tale parametro e la lattatemia, la glicemia e il peso del neonato misurati alla nascita e i gruppi di criticità neonatale. Da questa analisi è risultato un'associazione diretta tra la concentrazione ematica dei lattati e la criticità alla nascita del neonato. Quindi, neonati considerati critici in quanto presentano un indice APGAR inferiore a 6 risultano avere una concentrazione di lattato ematico maggiore rispetto ai soggetti non critici. La relazione riscontrata tra l'APGAR e la lattatemia è in linea con quanto già evidenziato da Groppetti et al [13] e Castagnetti et al [15], al contrario è in contrasto con quanto emerso dallo studio condotto da Mila et al [50] che riporta valori molto inferiori, pari a 2.1mmol/L [0.8–4.1mmol/L]. La causa di questo contrasto può essere probabilmente spiegata dai seguenti due rilievi. I due parametri in oggetto vengono rilevati, nel lavoro di Mila et al. [50], nell'arco delle prime 8 ore di vita dei neonati a differenza di quanto effettuato da Groppetti et al [13] e Castagnetti et al [15], che, come descritto sia in medicina veterinaria [14] che in umana [30, 32], li eseguono rispettivamente alla nascita ed entro i primi 5 minuti di vita. Oltre a questo la concentrazione dei lattati decresce progressivamente nelle prime 24 ore di vita, così come descritto da Castagnetti et al [15]. Sulla base di tutto questo è quindi evidente come i risultati di Mila et al [50] possano essere stati influenzati, in termini di riduzione dei valori, rispetto agli altri.

Infine, dallo studio statistico 3, che divide la popolazione in tre gruppi di criticità in funzione dell'APGAR score, così come descritti da Veronesi et al [12], emerge che non solo

il lattato nei neonati critici risulta essere maggiore ma è tanto maggiore quanto più alta è la criticità: neonati con APGAR < di 3 risultano infatti avere un valore di lattato molto maggiore rispetto a neonati appartenenti al gruppo dei non critici (APGAR >7) o dei moderatamente critici (APGAR 6-4). Mentre nessuna differenza statisticamente significativa è emersa tra il gruppo dei non critici e dei moderatamente critici. Dimostrando pertanto una relazione più forte tra gli alti valori di lattati e i punteggi APGAR più bassi.

La relazione presente tra l'ApGAR score e la lattatemia osservata negli studi statistici 2-3-8-9 è stata inoltre confermata dallo studio statistico 5, dove la popolazione in studio è stata divisa in due gruppi di criticità in funzione del valore soglia di 5 mmol/L che, secondo Groppetti et al [13], permette di distinguere neonati non critici (normolattatemicici, con valori < 5mmol/L) da neonati con stress/critici (iperlattatemicici, con valori > 5 mmol/L). Questo studio, oltre a confermare la relazione tra l'APGAR score e i lattati, ha evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi relativa alla glicemia e al BW/MBW. In particolare si evidenzia che neonati non critici (lattati < 5mmol/L) presentano un rapporto BW/MBW maggiore (e quindi un peso alla nascita maggiore) e una glicemia minore rispetto ai neonati appartenenti al gruppo dei critici (lattati > 5mmol/L). La relazione tra il peso alla nascita e la lattatemia conferma i risultati ottenuti da un precedente studio condotto da Bueno et al [122] e si trova in disaccordo con quanto descritto da Groppetti et al [13], che evidenziano una correlazione positiva tra lattati e il peso del neonato, e da Castagnetti et al [15], che non ha evidenziato nessuna correlazione tra peso e lattati. Quanto emerso da questo studio, ovvero che a neonati iperlattatemicici corrispondono pesi alla nascita minori può essere giustificato dal fatto che, così come descritto da Grundy [3], un basso peso alla nascita è associato ad un aumentato rischio di mortalità neonatale a causa dell'immaturità metabolica del soggetto, pertanto l'iperlattatemia osserva nei neonati sottopeso, o che comunque presentino un peso minore rispetto ai neonati normolattatemicici può essere un indicazione di un immaturità del sistema aerobico del neonato che quindi non è in grado di rispondere adeguatamente alla richiesta energetica da parte dell'organismo e che pertanto mette in atto meccanismi compensatori quali la glicolisi anaerobica [122, 123]. Mentre per quanto riguarda la relazione individuata tra i lattati e la glicemia, i risultati ottenuti sono in disaccordo con quanto osservato da Bueno et al [122] ma in accordo con quanto evidenziato

dal gruppo di studio di Castagnetti et al [15] dove, per l'appunto, si era osservata una correlazione significativa tra la glicemia e la lattatemia alla nascita, dove ad alti valori di lattati erano associati alti valori di glicemia. Nel presente studio i neonati di entrambi i gruppi possono essere considerati normoglicemici (gruppo 1 non critici valore medio della glicemia pari a $100,63 \pm 37,96$, gruppo 2 critici valore medio della glicemia pari a $134,83 \pm 68,41$), ovvero non si può definire che un gruppo presenti ipo/iperglicemia rispetto all'altro, ma i neonati appartenenti al gruppo dei critici presentano un valore medio di glicemia maggiore rispetto ai neonati non critici. Questo può essere conseguente allo stress a cui vanno incontro i neonati al momento del parto, in quanto è noto che stati di stress e/o ipossia causino un aumento della concentrazione ematica di glucosio [66].

In base alla nostra casistica, se andiamo a considerare neonati non critici in funzione dell'APGAR score, il valore massimo di lattato all'interno di questo gruppo risulta essere pari a $6,7\text{mmol/L}$, superiore al valore di cut-off stabilito dal Groppetti et al [13]. Ripetendo la stessa analisi statistiche ma dividendo i neonati in critici e non critici in funzione di un lattato di $6,7\text{mmol/L}$ è emerso che l'unica differenza statisticamente significativa tra i due gruppi è con la glicemia e il BW/MBW, e l'andamento di questi due parametri nei due gruppi è del tutto analogo quanto già osservato precedentemente.

Si è poi voluto valutare l'effetto madre (inteso come età, peso, glicemia al parto e parità), l'effetto cucciolata (dimensione della cucciolata), l'effetto cucciolo (sesso, posizione a livello di utero e presentazione fetale) e tipo di taglio cesareo eseguito su questi due parametri, APGAR score e lattatemia. Per quanto riguarda l'APGAR si è osservato una correlazione negativa con l'età della madre, ovvero all'aumentare dell'età della cagna diminuisce il valore del punteggio APGAR del neonato, in particolare valutando questa relazione all'interno dei singoli gruppi (critico/non critico in funzione dell'APGAR score) emerge che nei neonati considerati non critici l'APGAR non presenta nessuna dipendenza, mentre nei neonati critici viene confermata questa correlazione negativa. Questo risultato è in accordo con quanto già osservato in medicina umana dove l'APGAR score oltre che dipendere dall'età della madre dipende anche dalla parità [124].

Per quanto riguarda invece la lattatemia, si è osservato che può essere influenzata dalla madre, dalla dimensione della cucciolata, dalla taglia d'appartenenza e dalla presentazione

fetale. Ovvero il valore dei lattati alla nascita aumenta con l'aumentare dell'età e del peso materno, con l'aumentare della dimensione della cucciolata, ed infine cuccioli di grande taglia e neonati con presentazione podalica hanno una maggiore probabilità di essere iperlattatemicici rispetto a neonati di piccola taglia o con presentazione cefalica. Le dipendenze emerse da questo studio possono essere giustificate dal fatto che l'età della madre, cagne anziane, e le dimensioni della cucciolata sono fattori che predispongono a parti distocici e pertanto possono giustificare un aumento di stati ipossici e di stress nel neonato alla nascita [125]. Oltre al fatto che, non si può del tutto escludere, che pur essendo sane, le cagne più anziane possono avere uno stato generale meno prestante rispetto alle giovani e rispondere meno bene a tutte le esigenze fetali durante la gravidanza. Per quanto invece riguarda la taglia di apparenze, le cagne di grossa taglia incluse nello studio sono state sottoposte principalmente a tagli cesarei d'urgenza pertanto non si può escludere che si fosse già instaurato un stato di stress fetale, quindi il dato potrebbe essere falsato e maggiori studi condotti su un campione più omogeneo o eseguiti solo su tagli cesarei programmati o naturali potrebbe essere più opportuno al fine di meglio oggettivare questo dato. Infine, per quanto riguarda la presentazione fetale, ad oggi in medicina veterinaria nel cane non sono note indicazioni relative alla criticità o problemi al parto associati a feti cefalici o podalici, in quanto per l'appunto la presentazione non rientra, a differenza di quanto osservato in altre specie, tra i fattori di rischio di distocia, pertanto anche questo è un dato che meriterebbe ulteriori indagini [126]. Ad oggi in letteratura era stata evidenziata solamente la relazione tra il tipo di parto e il valore della lattatemia del neonato alla nascita, dove si era osservato che neonati nati mediante taglio cesareo d'urgenza presentavano un valore lattatemico maggiore rispetto a quelli nati da cesarei programmati, e i valori più alti si sono riscontrati in corso di parti naturali [13, 15, 127]. Nel presente studio non è emersa nessuna relazione tra i valori di lattatemia e il tipo di taglio cesareo eseguito.

Per quanto riguarda la glicemia, misurata alla nascita prima dell'assunzione del colostro, purtroppo ad oggi non sono presenti dati in letteratura. Mila et al [50] riportano che la valutazione dell'apporto energetico durante le prime 24 ore di vita, inteso come misurazione della concentrazione ematica del glucosio, è fortemente associata al rischio di morte del neonato nei primi giorni di vita ma sottolineano anche la mancanza di dati che permettano

di definire un neonato ipoglicemico alla nascita in quanto le loro misurazioni non sono state sempre eseguite immediatamente a fine parto prima dell'assunzione del colostro. In un nostro studio preliminare [76], eseguito su un numero ridotto di campioni, era stato individuato un valore soglia della glicemia, misurata immediatamente dopo il parto prima dell'assunzione del colostro, pari a 73,16 mg/dl, che permetteva di definire un neonato a rischio di ipoglicemia alla nascita. Questo dato era stato ottenuto andando a dividere la popolazione di studio in neonati critici e non critici in funzione dell'APGAR score e si era osservata una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi così ottenuti, con cuccioli critici (APGAR < 6) che presentavano un valore di glicemia più basso rispetto al gruppo dei non critici (APGAR >7). Questo risultato era in contrasto con quanto emerso dallo studio di Antonczyk et al [82] dove rilevano alti valori di glicemia in associazione a bassi valori dell'indice APGAR. Entrambi questi risultati non è stato possibile confermarli nel presente studio, in quanto non si è osservata nessuna una differenza statisticamente significativa in merito alla glicemia tra i due gruppi di criticità ottenuti in funzione dell'indice APGAR. I due gruppi di neonati difatti presentano valori glicemici pressoché sovrapponibili tra loro (gruppo neonati non critici valore medio della glicemia pari a 115,63 ± 58,58 mg/dl, gruppo neonato critici valore medio della glicemia pari a 111,95 ± 48,7 mg/dl).

Tuttavia dai risultati ottenuti dai studi statistici 8 e 9, che riguardano un campione ridotto di neonati, in quanto sono stati considerati solamente neonati appartenenti rispettivamente alla media e grande taglia, emerge una differenza statisticamente significativa in merito alla glicemia misurata alla nascita tra i neonati definiti critici e non critici e tale risultato è in accordo con quanto evidenziato nello studio preliminare condotto nel 2019 [76] ovvero che neonati critici presentano un glicemia minore rispetto ai non critici. In particolare osserviamo che in cuccioli di taglia media esiste una differenza statisticamente significativa tra APGAR, lattati e glicemia, dove cuccioli critici (APGAR < 6) presentano bassi valori di glicemia e alti valori di lattatemia, mentre nei cuccioli di grande taglia la differenza statistica è osservabile solo tra l'APGAR e la glicemia con lo stesso andamento descritto per cuccioli appartenenti alla media taglia. Purtroppo questo dato necessita di ulteriori indagini sia per i risultati contrastati emersi nel presente studio sia in quanto la letteratura disponibile

non fornisce informazioni sufficienti sulla relazione tra la concentrazione di glucosio e la sopravvivenza neonatale nella specie canina. Difatti in merito a quest'ultimo punto Castagnetti et al. [15] hanno osservato una tendenza a livelli di glucosio più elevati nei non sopravvissuti rispetto ai neonati sopravvissuti, il che è in accordo con i risultati di Antonczuk [82] ma in contrasto con lo studio condotto da Mila et al [50] dove bassi valori di glucosio sono stati associati ad un maggior rischio di mortalità neonatale.

Il peso è un parametro importante per la valutazione e l'esame clinico di un neonato. In particolare, il peso alla nascita sembra riflettere la maturità relativa degli organi, e un neonato che presenta un peso minore rispetto alla media della cucciolata d'appartenenza risulta fisiologicamente immaturo rispetto agli altri cuccioli [2]. Inoltre si è visto che neonati che presentano un basso peso alla nascita sono più a rischio di ipotermia e faticano a competere con i compagni per l'assunzione del latte, questo in associazione al fatto che la gluconeogenesi è molto limitata a causa dell'imaturità epatica, li predispone più facilmente a stati di ipoglicemia, e quindi più a rischio di morte [2, 3, 5, 19]. Purtroppo ad oggi in letteratura non sono disponibili dei valori che ci permettano di conoscere il corretto peso alla nascita che un neonato dovrebbe avere al fine di essere definito normale. Sappiamo dalla definizione di Mosier del 1978 [121] che un neonato che nasce con un peso inferiore al 25% della media può essere definito un neonato sottopeso. Ma questo dato seppur valido, può risultare di difficile utilità nella pratica, soprattutto a causa dell'alta variabilità morfologica presente tra le taglie e razze. Mila et al [49] nel loro studio stabiliscono il valore minimo di peso che un neonato a seconda della taglia di appartenenza deve avere al fine di essere definito normopeso. Tuttavia, il peso alla nascita varia non solo tra le diverse taglie [3] ma anche tra razze appartenenti alla stessa taglia [59, 128]. Idealmente sarebbe utile istituire un database con i pesi alla nascita per le singole razze, questo però comporterebbe un lavoro veramente lungo visto la presenza di oltre 300 razze di cani presenti nel mondo. Al fine di facilitare questa valutazione, così come già fatto in perinatologia equina, si è voluto individuare un valore espresso come percentuale del peso materno che potesse determinare indifferentemente dalla taglia e razza d'appartenenza se un neonato presenta un peso normale o no alla nascita. Si è pertanto calcolato l'indice di rapporto peso neonato - peso madre (BW/MBW) e, considerando solo neonati sani e con un

buon indice APGAR (>7), si è potuto definire che un neonato alla nascita può essere considerato normo-peso qualora presenti un peso pari al 0,9 - 2,74 % del peso materno. Inoltre così come già descritto in umana [104-107], nei cavalli [21, 22] ed in altre specie animali quali bovino [26] e suino [129], si è andato a misurare la percentuale di peso che la placenta deve avere in funzione del peso del neonato al fine di essere definita normale in quanto importante organo per lo sviluppo fetale e sembra influenzare il peso del nascituro. Considerando sempre il gruppo dei neonati sani e con un buon indice APGAR (> 7) è emerso che in funzione della popolazione considerata nel presente studio:

- la placenta in toto (dove si considera la parte zonata più tutte le membrane fetali e il cordone ombelicale), al fine di essere considerata normale, deve presentare un peso pari al 12,22 - 19,18% del peso del neonato alla nascita;
- la parte zonata, al fine di essere considerata normale, deve presentare un peso pari al 7,26 - 11,24 % del peso del neonato alla nascita.

Ad oggi, in letteratura è presente un unico lavoro, presentato ad un congresso nel 2016 [111], che mette in relazione il peso placentare in toto con il peso del neonato alla nascita. I risultati descritti in entrambi gli studi risultano pressoché sovrapponibili tra loro nonostante il *range* individuato nel presente lavoro risulti essere leggermente inferiore rispetto a quanto descritto da Gallana et al.[111] (rispettivamente 12,22 - 19,18% vs 11 - 22,3%). Tale differenza può essere giustificata sia dalla dimensione del campione considerato nei due studi sia dai criteri di inclusione considerati. Difatti la dimensione del campione considerato da Gallana et al [111] risulta essere minore rispetto a quella del presente studio, inoltre include nel calcolo tutti i neonati in quanto considerati sani mentre nel presente lavoro si è eseguita una selezione maggiore del campione in quanto si sono considerati solamente neonati sani e con un buon punteggio APGAR (> 7).

I valori da noi ottenuti, così come quelli dello studio citato, risultano essere leggermente maggiori e con un *range* più variabile rispetto a quanto riportato in letteratura per la specie equina, dove la placenta deve pesare circa l'11% del peso del puledro al fine di essere definita normale [21]. Questa differenza può essere legata alla differente placentazione tra le due specie e al fatto che il cane è una specie politocica.

Infine lo studio prevedeva anche la valutazione di aspetti macro- e microscopici della placenta in quanto organo vitale per lo sviluppo del conceptus e quindi, così come si è osservato già in umana ma anche in altre specie animali quali cavallo [22], bovino [26] e suino [25], si è voluto studiare se anche nella specie canina potesse esserci una relazione tra alcune caratteristiche di quest'organo e alcuni dei parametri ematici (glicemia e lattatemia) e clinici (APGAR score e peso) che ad oggi vengono considerati importati al fine di una valutazione di un neonato alla nascita.

Tra gli aspetti macroscopici considerati abbiamo il peso dell'intera placenta (intesa come parte zonata, involgii fetali e cordone ombelicale) e il peso, l'area e il volume della sola parte zonata. Visto la grande differenza morfologica presente all'interno della specie canina questi dati sono stati considerati sotto forma di indice di rapporto con il peso del neonato alla nascita con lo scopo di normalizzare il dato al fine dell'analisi statistica. Dal presente studio emerge che, neonati con un basso punteggio APGAR (< 6) presentano una parte zonata con un area maggiore (PLA/BW grande), e neonati che presentano un BW/MBW $< 0,9\%$, e che quindi possiamo considerare sottopeso, presentano un parte zonata più pesante (ZPLW/BW maggiore) rispetto ai neonati che possiamo considerare normo-peso (BW/MBW $0,9-2,74\%$) o sovrappeso (BW/MBW $> 2,74\%$). Il gruppo di studio di Tesi et al [59] ha evidenziato una correlazione positiva tra il peso del neonato, quella della placenta, l'area di trasferimento (intesa come parte zonata esclusi gli ematomi marginali) e l'area totale di vascolarizzazione placentare. In particolare osservano che ai neonati, che presentavano un peso minore alla nascita, è associata una placenta più leggera, una minor area di trasferimento e di vascolarizzazione. È però difficile andare a paragonare i risultati ottenuti da Tesi et al [59] con quelli di questo studio in quanto le strutture placentari considerate sono differenti: nel presente studio si è incluso nella valutazione della parte zonata anche gli ematomi marginali che invece Tesi et al [59] hanno escluso dall'analisi. Infine paragonando il nostro risultato con quanto osservato in altre specie, ovvero che neonati che presentano un peso minore alla nascita presentano una placenta più pesante, è in contrasto con quanto trovato da Rootwelt et al [130] nella specie suina e Elliott et al [22] per la specie equina. Loro infatti evidenziano che all'aumentare del peso della placenta corrisponde un incremento di peso corporeo rispettivamente del suinetto e del puledro. Tuttavia è comunque possibile ipotizzare che

anche nel cane, nonostante risultati contrastanti tra gli studi eseguiti, le dimensioni della placenta, in particolare modo della parte funzionale della placenta (la parte zonata), sono correlate con il peso del neonato, così come già osservato in altre specie animali [21, 22, 60, 129, 130] e in umana [104-107].

Infine per quanto riguarda la valutazione microscopica della placenta canina, sia per quanto riguarda i suoi aspetti normali che per quanto riguarda eventuali sue alterazioni che possano essere riconducibili alla criticità o mortalità neonatale, ad oggi sono presenti solo tre studi [62, 113]. Nonostante istologicamente a livello placentare le lesioni che si possono osservare sono di necrosi focale o multifocale, aree di mineralizzazione (calcificazione) e infiltrati leucocitari, un recente studio pubblicato da Sarli et al [113] ha evidenziato come solo le lesioni necrotiche, ed in particolar modo le necrosi multifocali siano relazionabili con la mobilità neonatale. Pertanto in questo studio ci si è concentrati nell'analisi delle lesioni necrotiche placentari e si è cercato un eventuale loro relazione con i parametri ematici (glicemia e lattatemia) e clinici (APGAR score e peso) del neonato e gli aspetti macroscopici della placenta stessa. Dallo studio si è evinto che la presenza o assenza di aree necrotiche, indifferentemente dal fatto che siano focali o multifocali, non incide in alcun modo sulla glicemia, la lattatemia, l'APGAR score (in accordo con i risultati ottenuti dallo studio pubblicato da Sarli et al [113]), il peso del neonato e altri parametri macroscopici della stessa. Inoltre non è stato evidenziato nessun effetto materno, effetto cucciolata o cucciolo, ma sembrerebbe esserci un'influenza da parte del tipo di taglio cesareo eseguito sulle lesioni osservate, ovvero in corso di taglio cesareo d'urgenza si osservano molte lesioni compatibili con necrosi multifocali rispetto a quelle osservate nei tagli cesari programmati. L'architettura delle lesioni degenerative e necrotiche evidenziate suggerisce che siano conseguenti principalmente a stati di ipossia. Le necrosi osservate potrebbero essere definite come un infarto placentare in quanto le lesioni apparivano associate a trombosi vascolare. Relativamente al tempo di insorgenza queste lesioni vengono definite iperacuta (moderate alterazioni degenerative e necrotiche principalmente delle cellule sinciziotrofoblastiche) o subacuta (necrosi coagulativa di entrambi i tipi di cellule trofoblastiche) e questo potrebbe riflettere la durata dell'ischemia e quindi essere compatibili con il parto. Sarli et al [113] ipotizzano che la presenza di degenerazione focale

e necrosi dovrebbe essere considerata un reperto di fondo, così come affermato anche dallo studio di Tesi et [62], mentre la presenza di distribuzione multifocale, se associata a trombosi delle arterie staminali, dovrebbe essere considerata un'importante lesione placentare che colpisce la morbilità neonatale. Ad oggi purtroppo non abbiamo sufficienti dati al fine di stabilire cosa è normale e cosa no, e soprattutto non possiamo stabilire quali sono le cause che determinano un tipo di lesione e l'impatto che tale lesione può avere sulla morbilità neonatale, pertanto ulteriori studi sono necessari.

Conclusione

I risultati forniti da questo studio hanno permesso di valutare la relazione esistente tra alcuni parametri ematici e clinici del neonato alla nascita, ritenuti importanti al fine di valutarne la criticità, intesa come maggiore probabilità di incorrere a morte nei primi giorni di vita, e parametri macro- e microscopici della placenta, in quanto organo fondamentale deputato allo sviluppo del conceptus. Per i parametri ematici sono stati considerati la glicemia e la lattemia, mentre per parametri clinici il punteggio APGAR e il peso.

Tra i parametri analizzati, il punteggio APGAR, che ci permette di definire la vitalità del neonato, e la lattatemia, che ci fornisce indicazioni sul di grado di ipossia neonatale, risultano essere i principali parametri che permettono al clinico di individuare prontamente neonati che necessitano di più attenzioni e pertanto fornirgli il supporto adeguato. Maggiori studi invece sono necessari al fine di poter andare a stabilire la relazione tra glicemia e sopravvivenza neonatale, e l'individuazione di un valore soglia che permetta di identificare prontamente un neonato ipoglicemico alla nascita.

Interessante la relazione individuata tra la lattatemia, la glicemia e il peso del neonato. In particolare, neonati iperlattatemicici sono risultati avere valori di glicemia maggiori e pesi minori rispetto ai neonati normolattatemicici. Questo risultato è a conferma di quanto già noto che un basso peso alla nascita è associato ad un aumentato rischio di mortalità neonatale a causa dell'imaturità metabolica del neonato, pertanto l'iperlattatemia osserva nei cuccioli sottopeso, o che comunque presentino un peso minore rispetto ai cuccioli normolattatemicici può essere un indicazione di un immaturità del sistema aerobico del neonato che quindi non è in grado di rispondere adeguatamente alla richiesta energetica da parte dell'organismo e perciò vengono messi in atto meccanismi compensatori quali la glicolisi anaerobica.

Per quanto riguarda invece la valutazione dei parametri macro- e microscopici della placenta ulteriori studi sono necessari al fine di meglio stabilire la loro utilità come strumento prognostico per poter prontamente identificare neonati critici che necessitano di una maggiore assistenza. Tuttavia dai risultati emersi dal presente studio è possibile concludere che le dimensioni della placenta, in particolare modo della parte funzionale della

placenta (la parte zonata), sono correlate con il peso del neonato, così come già osservato in altre specie animali e in umana. Mentre dal punto di vista istologico, purtroppo ad oggi non si hanno sufficienti dati al fine di stabilire cosa è normale e cosa no, e soprattutto non si può stabilire quali siano le cause che determinano un tipo di lesione e l'impatto che essa può avere sulla morbilità neonatale, pertanto sono necessari ulteriori studi.

Un risultato di notevole interesse derivante dal presente lavoro, infine, è stato quello di poter stabilire per la prima volta dei range di riferimento che permettano di definire un neonato normopeso alla nascita indifferentemente dalla taglia e/o razza d'appartenenza. Tale parametro è stato espresso come percentuale del peso del neonato rispetto al peso della madre. Inoltre, sebbene nella specie canina esistano solo studi preliminari su come caratteristiche della placenta, come ad esempio il peso, possano influenzare la sopravvivenza del neonato e/o i parametri che permettano di definirlo critico alla nascita, questa ricerca ha permesso di individuare, così come già descritto nella specie equina, la percentuale di peso che la placenta di cane rispetto al peso del neonato dovrebbe avere per essere ritenuta normale.



Article

Canine Placenta Histological Findings and Microvascular Density: The Histological Basis of a Negative Neonatal Outcome?

Giuseppe Sarli ¹, Carolina Castagnetti ^{1,2}, Carlo Bianco ¹, Giulia Ballotta ¹, Giorgia Tura ¹, Martina Caporaletti ³, Marco Cunto ^{1,*}, Giancarlo Avallone ¹, Cinzia Benazzi ¹, Fabio Ostanello ¹ and Daniele Zambelli ¹

- ¹ Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, Ozzano dell'Emilia, 40064 Bologna, Italy; giuseppe.sarli@unibo.it (G.S.); carolina.castagnetti@unibo.it (C.C.); carlo_bianco@yahoo.it (C.B.); giulia.ballotta2@unibo.it (G.B.); giorgia.tura3@unibo.it (G.T.); giancarlo.avallone@unibo.it (G.A.); cinzia.benazzi@unibo.it (C.B.); fabio.ostanello@unibo.it (F.O.); daniele.zambelli@unibo.it (D.Z.)
 - ² Health Science and Technologies Interdepartmental Center for Industrial Research (HST-ICIR), University of Bologna, Via Tolara di Sopra 41/E, Ozzano dell'Emilia, 40064 Bologna, Italy
 - ³ Clinica Veterinaria Tyrus, Via Aldo Bartocci 1/g, 05100 Terni, Italy; martinacaporaletti@gmail.com
- * Correspondence: marco.cunto@unibo.it; Tel.: +39-05-1209-7569



Citation: Sarli, G.; Castagnetti, C.; Bianco, C.; Ballotta, G.; Tura, G.; Caporaletti, M.; Cunto, M.; Avallone, G.; Benazzi, C.; Ostanello, F.; et al. Canine Placenta Histological Findings and Microvascular Density: The Histological Basis of a Negative Neonatal Outcome? *Animals* **2021**, *11*, 1418. <https://doi.org/10.3390/ani11051418>

Academic Editor: Biagio D'Aniello

Received: 25 April 2021

Accepted: 12 May 2021

Published: 15 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Accurate examination of the placenta, mainly by gross inspection rather than by histology, is common in clinical practice in some species, for example, in horses, but not carried out routinely in dogs. Placenta alterations in the mare can indicate malfunction, and data exist that intrauterine fetal nutrition influences both perinatal health, but also performances in adult life. Often placenta lesions are not easily appreciable on macroscopical examination, and histology is the best way to assess damage associated with sick newborns. The results of this paper underline the association between placenta injuries and outcome conditions in puppies and confirm, also in dogs, histological placenta investigation as a useful adjunctive tool in the evaluation of the newborn's health and prognosis.

Abstract: Placenta is essential for the development of the fetus, and its impaired function can lead to a negative outcome (i.e., neonatal mortality). In dogs, investigations on placenta histology and neonatal outcome in healthy bitches are lacking, and a contribution is provided in this study to emphasize the use of placenta histology in practice. Fifty-one placentas from 11 litters were collected during cesarean section, classified according to the litter size (large (L) or small (S)) and the outcome, this latter as healthy (Group 1) or dead within 7 days (Group 2). The placenta/puppy weight ratio (PPR) was calculated, and specimens were formalin-fixed and paraffin-wax embedded, and on the resulting histological slides, capillary density (CD) was quantified. Among necrosis, calcification, and intravascular leucocytes, only the presence of multifocal-confluent necrosis (significantly more frequent in Group 2) was associated with a higher risk of death within 7 days (odds ratio = 30.7). Mixed logistic regression ruled out the effect on death both of a bitch and cesarean type (programmed vs. emergency). PPR and CD values were associated with litter size; large litters had lower PPR ($p < 0.01$) and higher CD ($p < 0.05$) than small litters. The relationship between PPR and CD was negative and significant ($p < 0.01$). Necrosis was a frequent finding in canine placentas, but only when multifocal-confluent was it associated with a poor outcome. The litter size influenced PPR (lower in L) and CD (higher in L), and this is likely due to the plasticity of placenta adaptation.

Keywords: dog; placenta; histology; necrosis; capillary density; litter size

1. Introduction

The formation of the placenta is essential for the correct development of the fetus and for a normal pregnancy. In humans, proliferation, differentiation, and cell death

are the driving forces of placentation, determining the fate of the trophoblast cells [1]. Abnormalities at any stage of development, due to impaired proliferation, differentiation, or cell death, can lead to improper or pathological placental function and consequent complications related to pregnancy [1]. Focusing on veterinary medicine, the examination of the placenta is considered part of the obstetrical procedures in mares [2], and the proportion of sick foals is greater when placental abnormalities are observed [3,4]. In addition, the influence of the intrauterine life has been demonstrated as a determining factor of race performance in adult horses [5]. Different from the placenta in the horse, which is classified as of diffuse epitheliochorial nature, the canine placenta is zonary, lamellar, and endotheliochorial. The interface zone is the labyrinth composed of trophoblastic lamellae, in which cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts line the trophoblastic mesenchyme and cover the maternal vessels [6–8]. Canine syncytiotrophoblasts and cytotrophoblasts invade the maternal endothelium and endometrial glands early in gestation. These cells form “cuffs” around the maternal blood vessels and form the placental labyrinth [9,10]. Normal canine trophoblast invasion during implantation is relatively less invasive compared to other deciduate placental species (e.g., primates and rodents) [11]. Except for the marginal hematoma that forms in mid-gestation [9,10], canine trophoblasts do not come into direct contact with maternal blood [11]. Syncytiotrophoblasts are cells with up to ten centrally located nuclei and indistinct cell borders. Cytotrophoblasts are mononucleated, large cells that envelope maternal vessels, representing the interface between dam and fetus. The extracellular compartment of placental lamellae is inconspicuous [12].

The labyrinth is functionally organized in lobuli. Maternal stem arteries define the central axis of a lobule, while fetal stem arteries and veins occur in pairs and delimit the periphery of the lobule. Wherever these fetal vessels are sheathed by loose connective tissue, the lobule periphery becomes distinctly evident, as it happens in mink placentas. Arterioles branching from fetal and maternal stem arteries supply the respective capillary networks of the labyrinth and are drained by fetal and maternal venules [13].

Placental efficiency could be changed by alterations in the surface area for exchange, the thickness of the barrier between the maternal and fetal circulations, and/or in the density and architectural arrangements of the fetal and maternal vasculature within the placenta [14]. The natural intra-species variation in placental efficiency may be related to differences in the placental vasculature. In pigs and sheep, the breed differences in placental efficiency are associated with changes in capillary density with higher values in the more prolific breeds with smaller individual placentas and fetuses but higher fetal to placental weight ratios [14].

Data on the canine species aimed to investigate the clinico-pathological correlations between placenta histology and neonatal outcome in healthy bitches are still lacking. Few investigations describe gross and histologic features of canine placenta pathology, and case reports of reproductive disorders in experimental settings are sporadic [12,15–18]. Two recent papers on toy- and small-sized canine breeds focus mainly on macroscopic features and vessel area related to puppy weight [19] and on the description of histological findings in term placentas of healthy puppies [20].

The present investigation is aimed to correlate the histological changes in canine term placentas with neonatal outcomes and litter size.

2. Materials and Methods

Dogs submitted to cesarean section as elective surgery or undergoing emergency cesarean section at the Reproduction Unit of the Small Animal Clinical Service of the Department of Veterinary Medical Sciences—University of Bologna, Italy in the period November 2015–November 2018 were enrolled in this study following owners' consent. All bitches included in the study were healthy, regularly vaccinated, and dewormed; the serum chemistry profiles performed before surgery were within normal limits. Five out of eleven bitches were pluriparous; none of them experienced any problem during previous pregnancies, while six were healthy primiparous bitches. For each case, the following

data were collected: breed, weight, age, number of pregnancies (maternal data); APGAR score (assessed within five minutes from birth, according to Veronesi et al. [21]) body weight, placental weight, and outcome of each puppy (puppy data). Placental weight was assessed, measuring only the zonary placental region using a calibrated analytic scale in 1-g increments; the amnion and chorioallantois membranes and fluids were not considered. The placenta/puppy weight ratio expressed as a percentage (PPR) was calculated for each puppy. The whole placenta was fixed in 10% buffered formalin. Puppies were classified on the basis of the outcome: healthy (live born and healthy for 7 days after birth, Group 1), dead (live born but death occurring within 7 days after birth, Group 2). The litter size for each breed, in terms of the number of puppies, was compared with reference values [22]. If the litter size in the present study was greater than the reported mean value for the breed (litter size), it was defined as large (L); litters instead characterized by a lower number of puppies, compared with reference values, were defined small (S). As for the breeds not mentioned by Borges et al. [22], the litter size was defined large or small consistently with the live bodyweight of the breed and the criterion of affinity with other breeds belonging to the same morphological group according to the Fédération Cynologique Internationale (<http://www.fci.be/en/nomenclature>, accessed on 27 March 2021).

During the study period, data included in the dataset were from eleven parturitions, six of which scheduled and five emergency cesarean sections. Emergency cesarean sections were performed because of uterine inertia, no clinical sign of placental detachment was detected during clinical evaluation, and no fetus showed ultrasonographic signs of distress as reported by Lopate [23]. Fifty-one placentas from the eleven litters were included in the study (Table 1). A total of 43 placentas and puppy weights (13 from small litters and 30 from large litters) were acquired for the placental weight to puppy weight ratio (PPR) assessment.

Table 1. Clinical data collected for each litter and litter size (S: small; L: large).

Litter	Breed	Weight (Kg)	Age (Years)	No. of Pregnancy	Number of Puppies			Examined Placenta ¹	Litter Size	Breed Mean Litter Size
					Total	Group 1	Group 2			
1	Shetland Sheepdog	6.5	4	1	3	3	0	3	S	3.9 ^a
2	Boxer	35.8	-	-	11	9	2	11	L	6.6 ^a
3	Pyrenean Mountain Dog	46.0	5	2	5 ^c	1	2	3	S	7.0 ^b
4	Maremma sheepdog	-	7	1	5	5	0	5	S	7.0 ^b
5	Chihuahua	1.8	4	1	1	1	0	1	S	3.2 ^a
6	Boston Terrier	8.3	1	1	3	3	0	3	S	4.1 ^a
7	Mongrel	4.2	3	1	1	1	0	1	S	3.0 ^b
8	Labrador	51.0	7	2	12 ^d	3	-	3	L	6.9 ^a
9	French Bulldog	11.8	3	2	8 ^e	4	3	7	L	4.7 ^a
10	French Bullgog	10	4	2	7	6	1	7	L	4.7 ^a
11	Bull Terrier	26	6	1	7	7	0	7	L	5.5 ^a

^a Litter numerosity compared with reference values described by Borges et al. [22]; ^b Litter size as estimated on the basis of life body weight of the breed and criterion of affinity with other breeds belonging to the same morphological group according to the Fédération Cynologique Internationale (<http://www.fci.be/en/nomenclature>, accessed on 27 March 2021); S: small; L: large. Number of puppies born dead not included in the caseload; ^c 2 puppies; ^d 4 puppies; ^e 1 puppy; ¹ the weight was available and the PPR calculated only for 43 out of the 50 placentas.

The formalin-fixed placenta was trimmed to obtain an equatorial circumferential section, included in paraffin, and routinely processed for histology (hematoxylin-eosin stain and Alizarin stain of 4 μ thick sections).

2.1. Morphometry and Histopathology

For each case, 5 photographs, gif format, of random non-adjacent fields of the placental labyrinth were acquired (2088 \times 1550 pixels, obj = 40 \times , 7.35 pixels μ , and field area 60,100 μ^2) with a Leica microscope and Leica DFC320 DMLB camera (Leica, Wetzlar,

Germany). Digital Image Analysis was carried out with ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/> accessed on 13 May 2017). Fetal capillaries of the labyrinth were counted using a point-counting technique with a superimposed grid (distance between the links = 22 μ ; <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/grid.html> accessed on 23 December 2017), the capillaries lying on the intersections of the meshes were counted (total 108 intersections). For each histological preparation, the mean value of capillary density (CD) was calculated.

2.2. Statistical Analysis

The distribution of the variables was assessed using the Shapiro–Wilk test. Pairwise comparison of normally distributed data (CD) was carried out with a Student’s *t*-tests, while the pairwise comparisons of non-normally distributed data (PPR) were performed with Mann–Whitney U tests. Spearman’s *rho* test was used to analyze the correlation between non-normally distributed data. Dichotomous variables were analyzed with a Chi-square test. Statistical significance was set as $p < 0.05$.

Finally, a mixed logistic regression model was performed to investigate the potential of cesarean typology (elective or emergency), litter size (large or small), placental necrotic changes (focal or multifocal-confluent), placental calcification pattern (focal vs. linear + sclerotic), CD, PPR, and APGAR score for puppies outcome (Groups 1 and 2). The puppies’ outcomes were the dependent variable, all other variables were the fixed factors, and the bitch was used as the random factor. Additionally, the Odds Ratio (OR) and its 95% Confidence Interval (95% CI) were estimated with a p -value < 0.05 considered to be statistically significant, quantifying the strength of the association between the puppies’ outcomes and fixed factors.

Statistical analysis was performed with Statistica 8 (Statsoft-Dell, TX, USA) and SPSS 26.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

3. Results

3.1. Clinical Data and Placenta/Puppy Ratio

Histology was carried out on 51 placentas: 43 from healthy puppies (Group 1) and 8 placentas from puppies with a negative outcome (Group 2).

No differences in the PPR were detected between outcome Groups (Mann–Whitney U: 101; $p = 0.42$). The comparison of PPR between large and small litters was statistically significant (Mann–Whitney U: 39; $p < 0.05$): in large litters ($n = 30$), median PPR was 10.06%, with a range of 7.24–17.16, while in small litters ($n = 13$), median PPR was 18.78%, with a range of 13.55–33.33 (Figure 1a).

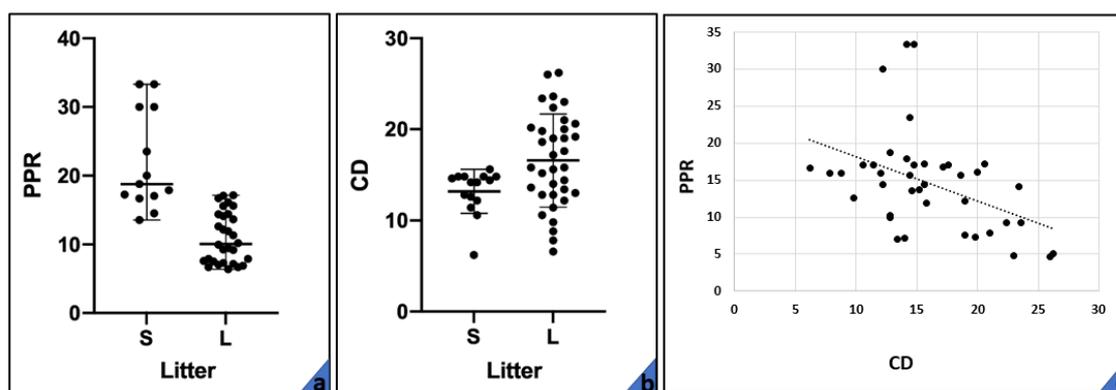


Figure 1. (a) Median and quartile range of PPR in small (S) and large (L) litters. (b) Mean and SD of CD in small (S) and large (L) litters. (c) Relationship between PPR and CD.

The median value of the APGAR score was 8 and 7 respectively for puppies belonging to Group 1 and Group 2. The main cause of death of the seven puppies belonging to Group 2 was Fading Puppy Syndrome (seven out of eight puppies) due to low birth weight and failure to thrive; one puppy died 2 h from birth due to unknown causes. Infectious causes were excluded on the basis of the clinical evaluation and parents' history.

3.2. Histopathology and Morphometry

The placental development, as determined by histological examination, was consistent with the gestational age. The most frequent lesions were degeneration and necrosis with focal, i.e., necrosis of one to three neighbor lamellae (Figure 2a) or multifocal-confluent, i.e., large area of necrosis associated or not to hemorrhage (Figure 2b) distribution. Areas with coagulative necrosis were well-demarcated, maintaining the outline of the lamellae (Figure 2a). Initial lesions evidenced vascular thrombosis and coagulative necrosis as shrunken and homogeneously eosinophilic syncytiotrophoblasts with loss of cellular details and chromatin pyknosis or karyorrhexis (Figure 2c). More severely affected areas were evidenced from cell swelling to coagulative necrosis in cytotrophoblasts. Other changes were scattered extravasated erythrocytes, and the maternal capillaries expanded with fibrin entrapping erythrocytes and a minimal amount of basophilic nuclear dust (karyorrhectic debris).

To compare degeneration/necrosis among the two outcome groups, the variable was considered dichotomous (absent or present) and the presence associated with the extension of the lesion (focal, multifocal, or multifocal confluent). Puppies of Group 1 showed degenerative-necrotic lesions in 18 out of 43 (41.9%) examined placentas; in 13/43 cases, the lesions were focal and multifocal-confluent in the remaining 5/43 cases. Puppies of Group 2 showed degenerative to necrotic lesions in 7/8 examined placentas (87.5%), 2/8 of which were focal and 5/8 multifocal-confluent. Overall, the proportion of placentas with necrotic lesions is significantly higher (Chi-square: 3.94; $p = 0.047$) in Group 2 (7/8; 87.5%) than in Group 1 (18/43; 41.9%). The Chi-square test showed that there was a significant difference in the proportion of the extension of the necrotic lesion between the two Groups (Chi-square: 11.72; $p = 0.003$). The multifocal distribution of necrosis and degeneration of placental labyrinth was more frequent in Group 2 (5/8; 62.5%) than in Group 1 (5/43; 11.6%) (Table 2).

Table 2. Synopsis of major histopathological findings in placenta within outcome Groups.

Major Histopathological Findings		Group 1 Positive/Examined (%)	Group 2 Positive/Examined (%)	<i>p</i> -Value
Necrosis	focal	13/43 (30.2)	2/8 (25.0)	<0.05
	multifocal-confluent	5/43 (11.6)	5/8 (62.5)	
	absent	25/43 (58.2)	1/8 (12.5)	
Intravascular leukocytes	present	7/43 (16.3)	1/8 (12.5)	>0.05
	absent	36/43 (83.7)	7/8 (87.5)	
Calcification	focal	24/43 (55.8)	2/8 (25.0)	<0.05
	linear and sclerotic	0/43 (0.0)	4/8 (50.0)	
	absent	19/43 (44.2)	2/8 (25.0)	

In some areas with necrosis or degeneration, the presence of intravascular leukocytes in the lumina of maternal blood vessels was evident (Figure 2d), and in the surrounding trophoblasts, chromatin condensation (pyknosis) and a moderate cytoplasmic clear swelling were apparent. Intravascular leukocytes were present in 7 out of 43 placentas of Group 1 and in 1 out of 8 placentas of Group 2 (Table 2), and no statistically significant difference among groups was identified (Chi-square: 0.07; $p > 0.05$). Inflammatory cells were always associated with necrosis or degeneration of the placenta.

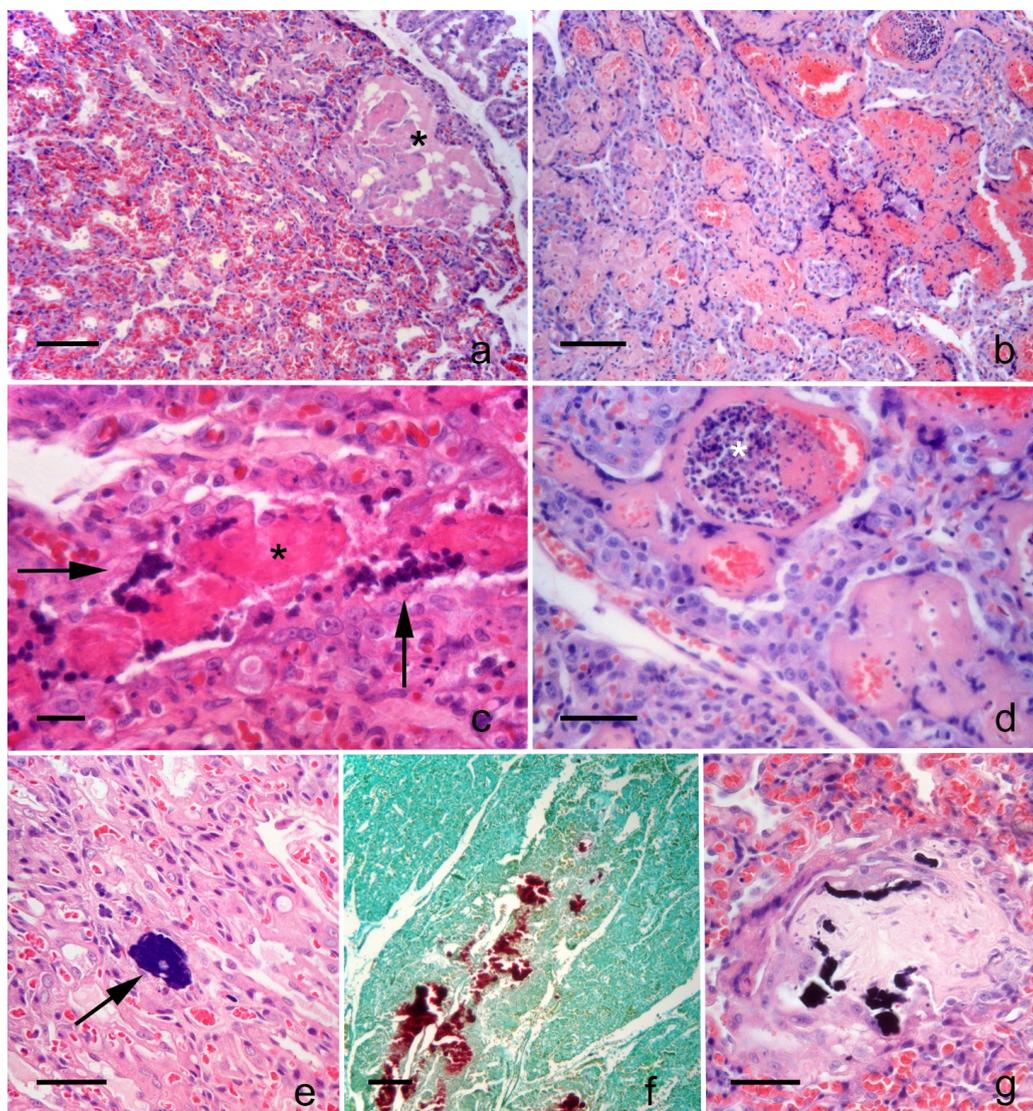


Figure 2. Placenta histological findings: (a) puppy of Group 1: focal necrosis of lamellae (asterisk); bar: 100 µm. (b) puppy of Group 2: large area of necrosis and hemorrhage. Bar 100 µm. (c) puppy of Group 2: highlights of vessel thrombosis (asterisk) in a necrotic lamella surrounded by a single layer of karyorrhectic trophoblasts (arrow); bar: 20 µm. (d) puppy of Group 2: necrosis of maternal vessels and intravascular karyorrhectic debris (asterisk); bar 50 µm. (e) puppy of Group 1: example of microfocal calcification (arrow) within a trophoblastic lamella; bar: 50 µm. (f) puppy of Group 2: linear pattern of mineralization, stained in red; bar: 200 µm. (g) puppy of Group 2: scattered, fragmented basophilic granular material embedded in mature collagen; bar: 50 µm. (a–e and g): hematoxylin-eosin stain; f: alizarin red stain for calcium.

Another frequent finding was calcification that showed to have three patterns: (1) focal, (2) linear and extensive, (3) mineralization of sclerotic areas (Table 2). The first pattern was characterized by the presence of rare radially arranged foci of basophilic granular to slender needle-like material surrounded by syncytiotrophoblast and cytotrophoblast cells

(Figure 2e). The second calcification pattern was linear and extensive, originating from the fetal side of the labyrinth and surrounded by trophoblast cells degenerated or palisading, with the presence of scant amounts of amorphous eosinophilic necrotic debris containing calcium, disclosed with alizarin red stain (Figure 2f). The third pattern of calcification was characterized by scattered fragments of basophilic granular material (mineralization) embedded in mature collagen-containing rare plump to stellated fibroblasts, delineated by a rim of trophoblastic cells (Figure 2g). Focal calcifications were detected within the labyrinth of 24 out of 43 puppies of Group 1 and 2 out of 8 of Group 2, but the difference in proportion was not significant ($p > 0.05$). Linear and sclerotic foci of calcifications of the trophoblastic mesenchyme (second and third mineralization patterns) were simultaneously present in none (0%) placentas of Group 1 and in 4 (50%) of Group 2 (Chi-square: 23.36; $p < 0.05$) (Table 2).

Among the additional histological findings, thrombosis of maternal arteries in one placenta of Group 2 and hematomas (similar to marginal hematophagous zone) was found in two subjects of Group 1 and in two subjects of Group 2.

The comparison of the capillary density (CD) between the outcome of Group 1 vs. Group 2 did not reveal any statistical differences (Student's *t*-test: 0.31; $p = 0.75$). Placentas from small litters ($n = 16$) had a CD (mean \pm sd) of 13.02 ± 2.41 , while those obtained from large litters ($n = 35$) had a density of 16.58 ± 5.11 (Figure 1b). The difference was significant (Student's *t*-test: 2.43; $p < 0.05$). The correlation between CD and PPR was negative, moderate, and significant (Spearman's *rho*: -0.41631 , $p < 0.05$) (Figure 1c).

Mixed logistic regression analysis (Table 3) showed an association between negative outcome (Group 2) and presence of focal necrosis (OR: 30.682; 95% CI: 1.805–1032.549; $p = 0.049$).

Table 3. Results of mixed logistic regression analysis.

Model Term	OR	95% Confidence Interval for OR	<i>p</i> -Value
Elective cesarean	4.682	0.001–11,425.246	0.651
Large litter size	0.976	0.002–1039.957	0.993
Necrosis absent or focal	30.682	1.805–1032.549	0.049
Calcification pattern absent	0.101	0.004–2.183	0.139
Capillary density lower than the median value (14.6)	2.162	0.112–47.055	0.609
PPR lower than the median value (13.6)	0.414	0.001–206.851	0.765
APGAR ≥ 7	0.659	0.045–8.914	0.748
Intercept	1.482	0.003–502.057	0.892

4. Discussion

As in human medicine, in veterinary medicine as well the placental histopathological examination may provide clinically useful data. In the present study, the histological lesions of canine term placentas are described, characterized, and quantified and their association with puppies' outcome tested with the aim to consider them as background or incidental findings.

Focal or multifocal degeneration and necrosis were commonly observed as reported in human medicine [24] and more recently in a paper on term placentas of healthy miniature and toy and middle-sized dogs [20]. The architecture of the degenerative and necrotic lesions suggests that hypoxia was the most likely cause. Necrosis could be defined as placental infarctions because initial lesions appeared associated with vascular thrombosis. The timing of these lesions was hyperacute (moderate degenerative and necrotic changes mainly of syncytiotrophoblastic cells) or subacute (coagulative necrosis of both trophoblast cell types). This might reflect the duration of the ischemia. This evidence suggests that cytotrophoblast cells, which are believed to have histiocytic features [12], are putatively

more resistant to hypoxia/anoxia, especially considering that they outline the stagnant blood lacunae of marginal placental hematoma. Assuming these lesions to be influenced by dystocia, we tested an effect of the cesarean type (elective vs. emergency) on death within 7 days after birth. Mixed logistic regression did not reveal different risks of death in puppies born by the two types of cesarean (OR = 4.7; $p = 0.651$), and this let us exclude the multifocal-confluent necrosis as an effect strictly linked to maternal dystocia of uterine inertia in the caseload used. The presence of subacute necrotic or their progression (chronic calcified) lesions emphasizes the genesis along with pregnancy and is not strictly associated with delivery.

Considering the results of statistical analysis among Groups, the focal or multifocal-confluent distribution patterns of placental degeneration and necrosis can have different influences on outcomes. If the lesion is focal, it has no consequences on the fetal and newborn outcome due to the efficiency of the residual placental tissue to compensate [25], and this feature is considered a normal finding in term canine placenta [20]. In the present study, the multifocal placental infarction was significantly more frequent in Group 2 and, in logistic regression, the only parameter associated with an increased probability of death within 7 days (OR = 30.7; $p = 0.049$). Consequently, the extent of the lesion may have influenced the outcome. The detection of focal degeneration and necrosis should be considered a background finding, as stated recently also by Tesi et al. [20], while the presence of multifocal distribution, if in conjunction with stem arteries thrombosis, should be deemed an important placental lesion affecting neonatal morbidity. The increased number of intravascular leukocytes does not seem to be a primary lesion but is most likely elicited by degenerative and necrotic changes.

Placental coagulative necrosis with various severity of placentitis was related to transmissible agents in dogs: *Brucella* spp., *Leptospira* spp., *Streptococcus canis*, *Canine herpesvirus*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, and *Leishmania* spp. [15–18,26], but evidence exists that placental necrosis is the consequence of a pure hemodynamic event: it was the main lesion in an experimental study in pregnant female dogs used as a model for human pre-eclampsia in which the lesion was caused only by prolonged ischemia [27] or in the placentas of healthy dogs with pharmacologic interruption of pregnancy [12].

Mineralization (calcification) was detected in three different patterns: the first can be defined microfocal and physiological; it occurs in the placenta of various species and can be interpreted as a background finding. Mineralization occurs because fetal blood is relatively more acid than maternal blood [28]. It should be stressed that this finding has never been associated with degeneration, necrosis, and/or inflammation. The second pattern of mineralization, linear and extensive, was always accompanied by degeneration/necrosis and was always found only in individuals of Group 2. This second pattern of calcification is consistent with dystrophic mineralization. The third pattern of mineralization is characterized by multiple foci of calcification in sclerotic areas that may represent a late stage of fibrotic evolution of a larger linear calcification because its coexistent with foci of extensive linear mineralization.

The presence of foci of hematophagous zones should be considered a background finding without pathological relevance, as it is often observed in the canine placenta [8].

This preliminary result shows that despite the median APGAR score of both groups of puppies being high (i.e., >7 according to Veronesi et al. [21]), there may be placental disorders that could lead, at least in our study, to death in the first week of life. In fact, the APGAR score evaluation allows a prompt identification of critical puppies at birth, which could be considered at risk of death during the first week of life and therefore require different degrees of medical assistance, but there is no guarantee that all those puppies showing higher APGAR scores will automatically survive [29].

Literature on the PPR has few examples in the dog to the best of our knowledge. One trial on Beagle dogs focused on the weight and gross morphometrical measures of placenta and puppies are available [30], but unfortunately, the litter size was not indicated, and pooled data were presented. In a recent paper, the PPR did not provide an association

with the size of the dam, comparing toy- and middle-sized breed [19]. In the dog, we tried to compare PPR data between healthy and dead puppies, but both univariate and mixed logistic regression did not reveal any influence of PPR on neonatal outcome. In the Thoroughbred mare, instead, the normal weight of fetal membranes is 4.4–7.7 kg (or 11% of the foal's weight at birth) [31]. If the membranes are significantly lighter, it implies that their surface area was smaller than normal, thus providing suboptimal nutritional support to the growing fetus. Membranes heavier than normal may be caused by edema and/or placentitis [32]. Further data have to be acquired in the dog to ascertain or not the meaning of the placental weight known for the foal.

The capillaries play a crucial role in the transport of oxygen and nutrients, and in the present study, perfusion was estimated in terms of capillary density, but no quantitative differences in microvascular density of placenta with the outcomes of puppies were noticeable. On the other hand, a "litter size effect" was evident on capillary density and PPR. Litter size displayed a moderate inverse correlation with capillary density, suggesting that a small placenta (in the case of large litters) gives rise to the exchange performance per unit area by increasing the capillarization. A similar result, albeit comparing different datasets, was reported in a recent paper from Tesi et al. [19], where the percentage of the area occupied by vessels (vascular index) had a negative correlation with puppy and placental weight. Even if microvascular density does not seem to influence puppy outcome, the result of this investigation suggests that the size of the litter modulates placental microvascular density in dogs.

Adopting a comparative point of view, the placental microvascular density is modulated in polytocous species of veterinary interest (porcine and ovine), and it is also known that the capillary density is greater in breeds with higher prolificacy, characterized by smaller placentas and increased fetoplacental ratio [14]. In light of these findings, the present study has putatively identified the same adaptation of increased capillary density in smaller placentas obtained from large litters. Angiogenesis, quantified by histological point count technique as the number of capillaries in trophoblastic lamellae (exchange area), confirms that the placenta is a plastic organ, adaptable to exchanging needs. The exchange performance is very likely to be higher per unit area in the placentas from large litters. In human medicine, the decrease in capillary density in placental villi was observed in pregnancies at an advanced maternal age, in pre-eclampsia, and in diabetes. The active or passive smoking and maternal anemia were instead related to an increase in capillaries (adaptive response to preplacental hypoxia) [33–35]. In the cases included in the present study, we had young adult bitches, of 4.4 ± 1.9 years of age, with clinical parameters within normal limits, and the influence of confounding factors (age, diseases) on placental microvascular density could be ruled out.

5. Conclusions

Since placenta histopathology provides insights about the fetal and neonatal outcome, in the present study, pathological changes of canine placenta were described and correlated to neonatal outcome. Overall, the CD and the PPR do not seem to have clinical or prognostic significance in the canine patient, whilst the placental histopathology can be informative in regards to the prognosis of the puppies at seven days. In particular, the multifocal-confluent necrosis, as revealed by histology, was significantly associated with a poor outcome for the puppies within seven days from birth. Because multifocal necrosis was the main finding associated with poor outcomes, it would be interesting to detect any alteration of placenta perfusion with advanced diagnostic imaging, reported as safe for use in pregnant mare and bitch [36,37], to have data to predict puppies outcome or plan intensive care at birth.

Author Contributions: Conceptualization, D.Z., C.C., and G.S.; methodology, G.T., D.Z., C.C., G.A., and C.B. (Cinzia Benazzi); software, C.B. (Carlo Bianco); validation, G.A. and C.B. (Cinzia Benazzi); formal analysis, C.B. (Carlo Bianco); investigation, M.C. (Martina Caporaletti and Marco Cunto), D.Z., and G.B.; resources, M.C. (Martina Caporaletti and Marco Cunto) and D.Z.; data curation, C.B. (Carlo Bianco), F.O. and G.S.; writing—original draft preparation, C.B. (Carlo Bianco), G.S.; writing—review and editing, M.C. (Martina Caporaletti and Marco Cunto), D.Z., C.C., G.B., G.S., and C.B. (Carlo Bianco); visualization, G.B.; supervision, D.Z. and G.S.; project administration, D.Z. and G.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: The samples (placenta) collected in this study were obtained after cesarean sections, and no direct procedure was carried out on the animals; therefore, this work did not require authorization according to European and Italian laws.

Data Availability Statement: Data generated or analyzed during this study are included in this published article. The raw datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ray, J.E. Matador and the Regulation of Cyclin E1 in Normal Human Placental Development and Placental Pathology. Ph.D. Thesis, Graduate Department of Physiology, University of Toronto, Toronto, ON, Canada, 2010.
2. Morresey, P. How to perform a field assessment of the equine placenta. In Proceedings of the 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, CO, USA, 4–8 December 2004.
3. Pirrone, A.; Antonelli, C.; Mariella, J.; Castagnetti, C. Gross placental morphology and foal serum biochemistry as predictors of foal health. *Theriogenology* **2014**, *81*, 1293–1299. [[CrossRef](#)]
4. Bianco, C.; Pirrone, A.; Boldini, S.; Sarli, G.; Castagnetti, C. Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from healthy and sick foals. *Theriogenology* **2014**, *82*, 1106–1112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Foote, A.K.; Ricketts, S.W.; Whitwell, K.E. A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology. *Equine Vet. J.* **2012**, *44*, 120–129. [[CrossRef](#)]
6. Miglino, M.A.; Ambrósio, C.E.; dos Santos Martins, D.; Wenceslau, C.V.; Pfarrer, C.; Leiser, R. The carnivore pregnancy: The development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology* **2006**, *66*, 1699–1702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Aralla, M.; Groppetti, D.; Caldarini, L.; Cremonesi, F.; Arrighi, S. Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Res. Vet. Sci.* **2013**, *95*, 15–22. [[CrossRef](#)]
8. Furukawa, S.; Kuroda, Y.; Sugiyama, A. A Comparison of the Histological Structure of the Placenta in Experimental Animals. *J. Toxicol. Pathol.* **2014**, *27*, 11–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Barrau, M.D.; Abel, J.H.; Torbit, C.A.; Tietz, W.J. Development of the implantation chamber in the pregnant bitch. *Am. J. Anat.* **1975**, *143*, 115–130. [[CrossRef](#)]
10. Sandoval, C.; Fisher, P.J.; Schlafer, D.H. Characterization of trophoblast cell populations by lectin histochemistry in canine placenta during development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **2001**, *57*, 199–206.
11. Carter, A.M.; Mess, A.M. The evolution of fetal membranes and placentation in carnivores and ungulates (Ferungulata). *Anim. Reprod.* **2017**, *14*, 124–135. [[CrossRef](#)]
12. Steiger, K.; Politt, E.; Hoefmann, T.; Meyer-Lindenberg, A.; Schoon, H.A.; Günzel-Apel, A.R. Morphology of canine placental sites after induced embryonic or fetal death. *Theriogenology* **2006**, *66*, 1709–1714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Krebs, C.; Winther, H.; Dantzer, V.; Leiser, R. Vascular Interrelationships of Near-Term Mink Placenta: Light Microscopy Combined with Scanning Electron Microscopy of Corrosion Casts. *Microsc. Res. Tech.* **1997**, *38*, 125–136. [[CrossRef](#)]
14. Fowden, A.L.; Sferruzzi-Perri, A.N.; Coan, P.M.; Constanca, M.; Burton, G.J. Placental efficiency and adaptation: Endocrine regulation. *J. Physiol.* **2009**, *587*, 3459–3472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Hashimoto, A.; Hirai, K.; Okada, K.; Fujimoto, Y. Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* **1979**, *40*, 1236–1240.
16. Dubey, J.P.; Rosypal, A.C.; Pierce, V.; Scheinberg, S.N.; Lindsay, D.S. Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2005**, *227*, 1266–1269. [[CrossRef](#)]
17. Gyurancz, M.; Szeredi, L.; Rónai, Z.; Dénes, B.; Dencso, L.; Dán, Á.; Pálmai, N.; Hauser, Z.; Lami, E.; Makrai, L.; et al. Detection of *Brucella canis*-induced reproductive diseases in a kennel. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2011**, *23*, 143–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Foster, A. Female reproductive system and mammary gland. In *Pathologic Basis of Veterinary Disease*; James, M.D.M., Zachary, F., Eds.; Elsevier Mosby: St. Louis, MO, USA, 2013.
19. Tesi, M.; Miragliotta, V.; Scala, L.; Aronica, E.; Lazzarini, G.; Fanelli, D.; Abramo, F.; Rota, A. Relationship between placental characteristics and puppies' birth weight in toy and small sized dog breeds. *Theriogenology* **2020**, *141*, 1–8. [[CrossRef](#)]

20. Tesi, M.; Miragliotta, V.; Scala, L.; Aronica, E.; Lazzarini, G.; Fanelli, D.; Rota, A.; Abramo, F. Gross and histological findings in the canine placenta and amnion at term: What's normal, abnormal or pathological? *Reprod. Domest. Anim.* **2021**. [[CrossRef](#)]
21. Veronesi, M.C.; Panzani, S.; Faustini, M.; Rota, A. An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology* **2009**, *72*, 401–407. [[CrossRef](#)]
22. Borges, K.S.; Tønnessen, R.; Nødtdvedt, A.; Indrebø, A. Litter size at birth in purebred dogs—A retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology* **2011**, *75*, 911–919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lopate, C. Gestational Aging and Determination of Parturition Date in the Bitch and Queen Using Ultrasonography and Radiography. *Vet. Clin. N. Am. Small Anim. Pract.* **2018**, *48*, 617–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Baergen, R.N. Placental Malperfusion. In *Manual of Benirschke and Kaufmann's Pathology of the Human Placenta*; Springer Science + Business Media Inc.: New York, NY, USA, 2005.
25. Prakash Telugu, B.; Green, J. Comparative Placentation. In *Comparative Reproductive Biology*; Constantinescu, H.S.a.G.M., Ed.; Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK, 2008.
26. Srivastava, R.; Sanyal, S.; Das, S. Histological changes in canine placenta during acute brucellosis. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **2013**, *2*, 139–143.
27. Abitbol, M.M.; Pirani, C.L.; Ober, W.B.; Driscoll, S.G.; Cohen, M.W. Production of experimental toxemia in the pregnant dog. *Obstet. Gynecol.* **1976**, *48*, 537–548.
28. Haschek, W.; Rousseaux, C.; Wallig, M. Female Reproductive System. In *Fundamentals of Toxicologic Pathology*; Academic Press: New York, NY, USA, 2010.
29. Veronesi, M.C. Assessment of canine neonatal viability—The Apgar score. *Reprod. Domest. Anim.* **2016**, *51* (Suppl. S1), 46–50. [[CrossRef](#)]
30. Fukuda, S.; Matsuoka, O. The measurement of the placenta, umbilical cord and components of amniotic fluid in beagle dogs. *Exp. Anim.* **1979**, *28*, 69–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Whitwell, K.E.; Jeffcott, L.B. Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. *Res. Vet. Sci.* **1975**, *19*, 44–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Vaala, W. How to stabilize a critical foal prior to and during referral. *Proc. Am Assoc. Equine. Pract.* **2000**, *46*, 182–187.
33. Žigić, Z.; Marković, S.; Grbeša, D.; Ramić, S.; Halilović, A. Quantitative research of capillaries in terminal villi of mature placentae. *Bosn. J. Basic Med. Sci.* **2010**, *10*, 147–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Rath, G.; Dhuria, R.; Salhan, S.; Jain, A.K. Morphology and morphometric analysis of stromal capillaries in full term human placental villi of smoking mothers: An electron microscopic study. *Clin. Ter.* **2011**, *162*, 301–305.
35. Sankar, K.D.; Bhanu, P.S.; Ramalingam, K.; Kiran, S.; Ramakrishna, B.A. Histomorphological and morphometrical changes of placental terminal villi of normotensive and preeclamptic mothers. *Anat. Cell Biol.* **2013**, *46*, 285–290. [[CrossRef](#)]
36. Orlandi, R.; Vallesi, E.; Boiti, C.; Polisca, A.; Troisi, A.; Righi, C.; Bargellini, P. Contrast-enhanced ultrasonography of maternal and fetal blood flows in pregnant bitches. *Theriogenology* **2019**, *125*, 129–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Freccero, F.; Toaldo, M.B.; Castagnetti, C.; Cipone, M.; Diana, A. Contrast-Enhanced Ultrasonography of the Uterus during Normal Equine Pregnancy: Preliminary Report in Two Mares. *J. Equine Vet. Sci.* **2017**, *54*, 42–49. [[CrossRef](#)]

Allegato 2

Schede madre compilate al momento del taglio cesareo con tutti i dati anamnestici materni.

CAGNA/GATTA _____		DATA ___/___/20___
Razza _____	Età _____	Peso _____ kg
Proprietario _____		
Gravidanza n. _____	Durata: _____ gg	
NOTE _____		

Antiparassitari: S/N _____	data _____	
Vaccinazioni: S/N _____	data _____	
Alimentazione _____		
Problemi durante precedenti gravidanze: S/N _____		

Problemi durante questa gravidanza: S/N _____		

Monitoraggio della gravidanza: S/N _____		

Calo della temperatura rettale h _____	Inizio I fase h _____	Inizio II fase h _____
Lattatemia madre T_0 mmol/l _____ h _____	Glicemia madre T_0 mg/dl _____ h _____	
Lattatemia madre T_{0b} mmol/l _____ h _____	Glicemia madre T_{0b} mg/dl _____ h _____	
Lattatemia madre T_{2h} mmol/l _____ h _____	Glicemia madre T_{2h} mg/dl _____ h _____	
Lattatemia madre T_{24h} mmol/l _____ h _____	Glicemia madre T_{24h} mg/dl _____ h _____	
Colostro: _____ % scala Brix		
NOTE _____		

T_0 madre: all'inizio della fase espulsiva/al ricovero se il parto è già iniziato/prima dell'induzione dell'anestesia;
 T_{0b} madre: dopo ultima nascita/dopo estubazione;
 T_{2h} madre: 2h dopo la fine del parto; **T_{24h} madre:** 24h dopo la fine del parto

Allegato 3

Scheda nascita neonato compilata al momento del taglio cesareo.

CAGNA/GATTA _____

CUCCIULO/GATTINO N. _____

nato vivo vitale a 2h vitale a 24h

nato morto morto entro 2h morto tra le 2 e le 24h

parto spontaneo parto assistito cesareo programmato. cesareo d'urgenza

comparsa membrane fetali: h _____ nascita: h _____

Apgar Score **ENTRO 5 minuti:** Mucose 0 1 2 Freq. cardiaca <180 180-220 >220

Resp. non piange/<6 piange piano/6-15 piange forte/>15

Risposta allo stimolo 0 1 2 Motilità 0 1 2

TOT _____

Sesso: ♀ ♂ temperatura °C: _____ peso: _____ g(_____% peso madre)

placenta: peso g _____ (_____% peso cucciolo) riflesso di suzione: h _____

ricerca mammella: h _____ I poppata: h _____ esp. meconio: h _____ I minzione: h _____

es.macroscopico: _____

NOTE:

In che corno si trova: _____ podalico cefalico

Malfomazioni: _____

PARTE ZONATA PLACENTA:

Peso _____, Lunghezza _____, Larghezza _____, Spessore _____, Volume _____

ESAMI COLLATERALI (determinazioni rapide)

Lattatemia neonato T_0 mmol/l _____ h _____ Glicemia neonato T_0 mg/dl _____ h _____

Lattatemia neonato T_{2h} mmol/l _____ h _____ Glicemia neonato T_{2h} mg/dl _____ h _____

Lattato liquido amniotico mmol/l _____

NOTE: _____

VALUTAZIONI SUCCESSIVE

Peso T_{12h} _____ g (_____% calo) temperatura _____ °C: _____

Lattatemia neonato T_{24h} mmol/l _____ h _____ Glicemia neonato T_{24h} mg/dl _____ h _____

Peso T_{24h} _____ g (_____% calo) temperatura _____ °C: _____

Allegato 4

Abstract del lavoro preliminare sulla glicemia nel neonato presentato al Fist ECAR Symposium Vienna, Austria, 5-6 Luglio 2019:

"Evaluation of glycemic in newborn puppies right after birth born via C-Section" [76]

Evaluation of glycaemia in newborn puppies right after birth born via C-section

G. Ballotta, M. Cunto, E. Anicito Guido, D. Zambelli
Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum
University of Bologna, Italy. E-mail: giulia.ballotta2@unibo.it

Newborn puppy has an immature liver, which is not able to perform an adequate gluconeogenesis and glycogenolysis. Therefore, in the first 24 hours of life, hepatic glycogen store decline by more than 50% [1] and much part of the blood glucose concentration is guaranteed by ingestion of colostrum and milk [2]. In literature the reference value of normal glycaemia for newborn puppy vary widely [1, 3] and there are no indications about the normal glycaemia right after birth before any colostrum intake. The aim of this study was to establish the level of glycaemia right after birth, before ingestion of colostrum, in order to determine a threshold value of blood glucose under which a puppy could be considered at risk for hypoglycaemia.

A total of eighty-six puppies of different breed, born via C-section from healthy and normoglycemic bitches and without ecographic signs of fetal distress [4] has been included in the study. Fourteen puppies were excluded from the study because euthanised due to congenital abnormalities. Immediately after resuscitation, APGAR score and glycaemia of the remaining seventy-two pups have been recorded.

Puppy has been divided in two groups, critical (C) and healthy (H), in function of APGAR score [5]. The T-test indicate that puppies belonging to H-APGAR group show to have a higher glycaemia respect C-APGAR group. These data demonstrate a relationship between APGAR score and glycaemia. The mean blood glucose value of 114.53 mg/dl +/- 41.47 mg/dl (range 73.16 mg/dl – 155.83 mg/dl) has been established from H-APGAR group. This data permit to consider normal value of glycaemia right after birth ≥ 73.16 mg/dl.

Hypoglycaemic puppies [6] and puppies with glycaemia < 92 mg/dl at day 1 of life [2] are associated with an increased risk of death because more sensitive to hypothermia and may not be able to nurse and consequently to maintain glucose concentrations. All puppies included in the study born with a glycaemia < 73.16 mg/dl has been considered at risk and adequate precaution has been taken by the clinicians and breeders. All puppies were alive at 14 days of life. These considerations and the statistical analysis of data allow to establish that normal glycaemia right after birth is ≥ 73.16 mg/dl and that all puppies with a lower value at birth, before any ingestion of colostrum, could be considered by clinician as puppy at risk of neonatal mortality, that require special attention to avoid neonatal death.

References

[1] Grundy, S.A., (2006) *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 36: 443-459. [2] Mila, H., et al. (2017). *Preventive Veterinary Medicine*, 143: 11-20. [3] Rosset, E., et al., (2012) *Veterinary Clinical Pathology*, 41: 272-282. [4] Lopate, C., (2008) *Theriogenology*, 70(3): 397-402. [5] Veronesi, M.C., et al., (2009) *Theriogenology*, 72(3): 401-7. [6] Münnich, A. and U. Küchenmeister, (2014) *Reproduction in Domestic Animal*, 49(2): 64-74.

Allegato 5

Abstract del lavoro preliminare sulla relazione esistente tra la placenta, l'APGAR e la glicemia nel neonato presentato al Fist ECAR Symposium Vienna, Austria, 5-6 Luglio 2019:

“Relationship between Placenta, puppies APGAR score and glucose concentration at birth”[112]

Relationship between Placenta, puppies APGAR score and glucose concentration at birth.

G. Ballotta, M. Cunto, E. Anicito Guido, D. Zambelli
Department of Veterinary Medical Sciences, Alma Mater Studiorum
University of Bologna, Italy. E-mail: giulia.ballotta2@unibo.it

It has been shown that low birth weight puppies usually have a higher metabolism and require higher energy, therefore they are at higher risk of getting hypoglycaemic [1]. Moreover, since birth weight could be influenced by many factors included a placenta sufficiency [2], evaluation of possible association between glycaemia and the placenta could be interesting. The aim of this study was to assess the puppy weight at birth (BW), placental area (PLA) and weight in relation with APGAR score and glycaemia, owing to the fact that low birth weight, low APGAR score and low glycaemia has been found to be a sign of high risk of neonatal mortality [3].

Seventy-four puppies of different breeds born via C-section from healthy bitches and without ecographic signs of neonatal distress [4] have been included in this study. APGAR score, BW and glycaemia has been recorded for each pup. Regarding the placenta, the whole weight (PLW), the zony region weight (ZPLW) and the PLA have been registered. Puppy has been divided in two groups, critical (C) and healthy (H) puppies, first in function of the APGAR score, then of the glycaemia (glucose threshold from authors' unpublished data) and compared via statistic T-test. Between C-Apgar group and H-Apgar group, no statistical difference has been found in PLW/BW, ZPLW/BW and PLA/BW rates. Puppies belonging to C-Apgar group have a lower glycaemia at birth respect the H-Apgar group with a statistical significance.

Between C-glucose and H-glucose groups no statistical difference has been found in PLW/BW and PLA/BW rate. In C-glucose puppies APGAR score was lower than in the H-glucose ones. Moreover, the ZPLW/BW rate was significantly different between the two groups, with mean value in C-glucose group of 10.2% and 9% in H-glucose group. In C-glucose group the BW mean value result to be lower than that of puppies belonging to H-glucose group, and the ZPLW mean value result higher, resulting in a bigger rate of ZPLW/BW.

Data demonstrated that glucose concentration and APGAR score are related between them and that glucose is related to the ZPLW but not with PLA. Moreover, the ZPLW/BW result to be higher in puppies with a low glycaemia as consequence of a higher ZPLW and lower BW at birth. The relation between glucose, ZPLW and BW could be ascribed to the placenta function. It could be interesting to do a histological evaluation of these placenta for establish if there are any histological finding that could support the relation between glucose and placenta.

References. [1] Münnich, A. et al, (2014) *Reproduction in Domestic Animal*, 49(2): 64-74. [2] Lawler, D.F., (2008) *Theriogenology*, 70: 384 - 392. [3] Mila, H. et al (2017). *Prev. Veterinary Medicine* 143: 11-20. [4] Lopate C. (2018) *Veterinary Clinic of North America Small Animal Practice* 48(4): 617-638

Bibliografia

1. Nielen, A.L.J., et al., Investigation of mortality and pathological changes in a 14. month birth cohort of boxer puppies. *Vet. Rec.*, 1998. **142**: p. 602-606.
2. Gill, M.A., *Perinatal and Late Neonatal Mortality in the Dog*. 2001, University of Sydney: Sydney, Australia.
3. Grundy, S.A., *Clinically Relevant Physiology of the Neonate*. *Veterinary Clinics Small Animal Practice*, 2006. **36**: p. 443-459.
4. Tonnessen, R., et al., Canine perinatal mortality: a cohort study of 224 breeds. *Theriogenology*, 2012. **77(9)**: p. 1788-1801.
5. Munnich, A. and U. Kuchenmeister, Causes, diagnosis and therapy of common diseases in neonatal puppies in the first days of life: cornerstones of practical approach. *Reprod Domest Anim*, 2014. **49 Suppl 2**: p. 64-74.
6. Lawler, D.F., Neonatal and pediatric care of the puppy and kitten. *Theriogenology*, 2008. **70**: p. 384 - 392.
7. Munnich, A., The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Vet Res Commun*, 2008. **32 Suppl 1**: p. S81-5.
8. Galanakis, E., Apgar score and Soranus of Ephesus. *Lancet*, 1998. **352**: p. 2012-3.
9. Casey, B.M., D.D. McIntire, and K.J. Leveno, The continuing value of the Apgar score for the assessment of newborn infants. *N. Engl. J. Med.*, 2001. **344**: p. 467-71.
10. Shepherd, C., Post-parturition examination of the newborn foal and mare. *Pract.*, 2010. **32**: p. 97-101.
11. Sanches, L.C. and S. Giguère. Newborn foal – now what? in North American Veterinary Conference. 2012. Orlando, FL, USA.
12. Veronesi, M.C., et al., An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis. *Theriogenology*, 2009. **72(3)**: p. 401-7.

13. Groppetti, D., et al., Evaluation of newborn canine viability by means of umbilical vein lactate measurement, apgar score and uterine tocodynamometry. *Theriogenology*, 2010. **74**(7): p. 1187-96.
14. Veronesi, M.C., Assessment of canine neonatal viability-the Apgar score. *Reprod Domest Anim*, 2016. **51 Suppl 1**: p. 46-50.
15. Castagnetti, C., et al., Time-dependent changes and prognostic value of lactatemia during the first 24 h of life in brachycephalic newborn dogs. *Theriogenology*, 2017. **94**: p. 100-104.
16. Hoseth, E., et al., Blood glucose levels in a population of healthy, breast fed, term infants of appropriate size for gestational age. *Arch. Dis. Child. -Fetal Neonatal*, 2000. **83**: p. 117-119.
17. Gorman, M.E., *Clinical Chemistry of the puppy and kitten*, in *Small animal pediatrics, the first 12 months of life*, K.L. Peterson and M.A. Kutzler, Editors. 2011, Elsevier- Saunders. p. 259 - 275.
18. Aoki, T. and M. Ishii, Hematological and biochemical profiles in peripartum mares and neonatal foals (Heavy Draft Horse). *Journal Equine Veterinary Science*, 2012. **32**: p. 170-176.
19. Miettinen, E.L., R.M. Kliegman, and K.Y. Tserng, Fetal and neonatal responses to extended maternal canine starvation. I. Circulating fuels and glucose and lactate turnover. *Pediatr Res*, 1983. **17**(8): p. 634-8.
20. Kaplan, C., Gross Examination of the Placenta. *Surg Pathol Clin*, 2013. **6**(1): p. 1-26.
21. Whitwell, K.E. and L.B. Jeffcott, Morphological studies on the fetal membranes of the normal singleton foal at term. *Res Vet Sci*, 1975. **19**(1): p. 44-55.
22. Elliott, C., J. Morton, and J. Chopin, Factors affecting foal birth weight in Thoroughbred horses. *Theriogenology*, 2009. **71**(4): p. 683 - 689.
23. Bianco, C., et al., Histomorphometric parameters and fractal complexity of the equine placenta from healthy and sick foals. *Theriogenology*, 2014. **82**(8): p. 1106-12.

24. Pirrone, A., et al., Gross placental morphology and foal serum biochemistry as predictors of foal health. *Theriogenology*, 2014. **81**(9): p. 1293-1299.
25. Michael, K., B. Ward, and W. Moore, Relationship of fetal to placental size: the pig model. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1983. **16**(1): p. 53-62.
26. Echternkamp, S., Relationship between placental development and calf birth weight in beef cattle. *Anim Reprod Sci*, 1993. **32**: p. 1-13.
27. Wehrend, A., B.-R. Hecker, and H. Bostedt, Kontrolle und Behandlung von Welpen unmittelbar post natum. *Praktischer Tierarzt*, 2002. **83**(6): p. 522-528.
28. Kustritz, M.V.R., Canine Neonatal Disorders, in *Management of pregnant and neonatal dogs, cats and exotic pets*. 2012. p. 129.
29. Apgar, V., A Proposal for a New Method of Evaluation of the Newborn Infant. Originally published in July 1953, volume 32, pages 250-259. *Anesth Analg*, 2015. **120**(5): p. 1056-1059.
30. Apgar, V. and L.S. James, Further observations on the newborn scoring system. *Am J Dis Child*, 1962. **104**: p. 419-28.
31. Apgar, V., The newborn (Apgar) scoring system. *Ped Clin N Am*, 1966. **13**: p. 645-50.
32. *Textbook of Neonatal Resuscitation*. 6th ed, ed. A.A.o.P.a.A.H. Association. 2011: Elk Grove Village.
33. *The Apgar Score*. *Pediatrics*, 2015. **136**(4): p. 819-22.
34. Harrington, D.J., et al., The long-term outcome in surviving infants with Apgar zero at 10 minutes: a systematic review of the literature and hospital-based cohort. *Am J Obstet Gynecol*, 2007. **196**(5): p. 463.e1-5.
35. Kasdorf, E., et al., Improving infant outcome with a 10 min Apgar of 0. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, 2015. **100**(2): p. F102-5.
36. Schulz, J., B. Plischke, and H. Braun, [Sucking and drinking behavior as criteria of vitality in newborn calves]. *Tierarztl Prax*, 1997. **25**(2): p. 116-22.

37. Herfen, K. and H. Bostedt, [Acid-base status in newborn calves during the first days of life considering different states of vitality]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1999. **112**(5): p. 166-71.
38. Vaala, W., How to stabilize a critical foal prior to and during referral. *Proc Am Assoc Equine Pract*, 2000. **46**: p. 182-7.
39. Alonso-Spilsbury, M., et al., Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review. *Anim Reprod Sci*, 2005. **90**(1-2): p. 1-30.
40. Palmer, J.E., *Neonatal foal resuscitation*. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2007. **23**(1): p. 159-82.
41. Finster, M. and M. Wood, The Apgar score has survived the test of time. *Anesthesiology*, 2005. **102**(4): p. 855-7.
42. Batista, M., et al., Neonatal viability evaluation by Apgar score in puppies delivered by cesarean section in two brachycephalic breeds (English and French bulldog). *Anim Reprod Sci*, 2014. **146**(3-4): p. 218-26.
43. Williams, A.F., Hypoglycaemia of the newborn: a review. *Bull World Health Organ*, 1997. **75**(3): p. 261-90.
44. Indrebø, A., C. Trangerud, and L. Moe, Canine neonatal mortality in four large breeds. *Acta Vet. Scand.*, 2007. **49**.
45. Laptook, A.R. and M. Watkinson, Temperature management in the delivery room. *Semin Fetal Neonatal Med*, 2008. **13**(6): p. 383-91.
46. Devillers, N., J. Le Dividich, and A. Prunier, Influence of colostrum intake on piglet survival and immunity. *Animal*, 2011. **5**(10): p. 1605-12.
47. Smith, F.O., *Prenatal care of the bitch and queen*, in *Small Animal Pediatrics: the first 12 months of life*, K.L. Peterson and M.A. Kutzler, Editors. 2011, Elsevier- Saunders. p. 1-15.
48. Mila, H., A. Grellet, and S. Chastant-Maillard. Prognostic value of birth weight and early weight gain on neonatal and pediatric mortality: A longitudinal study on 984 puppies.

in Proceedings of the 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction—ISCFR. 2012. Canada.

49. Mila, H., et al., Differential impact of birth weight and early growth on neonatal mortality in puppies. *J Anim Sci*, 2015. **93**(9): p. 4436-42.

50. Mila, H., et al., Monitoring of the newborn dog and prediction of neonatal mortality. *Prev Vet Med*, 2017. **143**: p. 11-20.

51. Groppetti, D., et al., The role of birth weight on litter size and mortality within 24h of life in purebred dogs: what aspects are involved? *Anim Reproduction Science*, 2015. **163**: p. 112-119.

52. Kustritz, M.V.R., *History and physical examination of the neonate*, in *Small Animal pediatrics: the first 12 months of life*, K.L. Peterson and M.A. Kutzler, Editors. 2011, Elsevier - Saunders. p. 20-27.

53. Fiszdon, K. and I. Kowalczyk, Litter size, puppy weight at birth and growth rates in different breeds of dogs.

54. Schrank, M., et al., Bodyweight at Birth and Growth Rate during the Neonatal Period in Three Canine Breeds. *Animals*, 2020. **10**: p. 8.

55. Mugnier, A., et al., Birth weight as a risk factor for neonatal mortality: Breed-specific approach to identify at-risk puppies. *Prev Vet Med*, 2019. **171**: p. 104746.

56. Sparkes, A.H., et al., A questionnaire-based study of gestation, parturition and neonatal mortality in pedigree breeding cats in the UK. *J Feline Med Surg*, 2006. **8**(3): p. 145-57.

57. Gatel, L., et al., Relationships between fetal biometry, maternal factors and birth weight of purebred domestic cat kittens. *Theriogenology*, 2011. **76**(9): p. 1716-22.

58. Mugnier, A., et al., Low and very low birth weight in puppies: definitions, risk factors and survival in a large-scale population. *BMC Vet Res*, 2020. **16**(1): p. 354.

59. Tesi, M., et al., Relationship between placental characteristics and puppies' birth weight in toy and small sized dog breeds. *Theriogenology*, 2020. **141**: p. 1-8.

60. Ashworth, C.J., et al., Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs. *Reprod Suppl*, 2001. **58**: p. 233-46.
61. Howie, P.W., Causes of intrauterine growth retardation. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1982. **285**(6336): p. 156-7.
62. Tesi, M., et al., Gross and histological findings in the canine placenta and amnion at term: What's normal, abnormal or pathological? *Reproduction in Domestic Animals*, 2021. **56**(5): p. 691-702.
63. Kienzle, E., J. Zentek, and H. Meyer, Body composition of puppies and young dogs. *J Nutr*, 1998. **128**(12 Suppl): p. 2680s-2683s.
64. Kliegman, R.M., E.L. Miettinen, and P.A. Adam, Fetal and neonatal responses to maternal canine starvation: circulating fuels and neonatal glucose production. *Pediatr Res*, 1981. **15**(6): p. 945-51.
65. Kliegman, R.M. and S. Morton, The metabolic response of the canine neonate to twenty-four hours of fasting. *Metabolism*, 1987. **36**(6): p. 521-6.
66. Gorman, M.E., *Clinical Chemistry of the Puppy and Kitten*, in *Small animal Pediatrics: the first 12 Months of life*, K.L. Peterson and M.A. Kutzler, Editors. 2011, Elsevier - Saunder. p. 259-275.
67. Miettinen, E.L. and R.M. Kliegman, Fetal and neonatal responses to extended maternal canine starvation. II. Fetal and neonatal liver metabolism. *Pediatr Res*, 1983. **17**(8): p. 639-44.
68. Center, S.A., W.E. Hornbuckle, and J.D. Hoskins, *Veterinary Pediatrics: Dogs and Cats from Birth to Six Months*. 3rd ed, ed. J.D. Hoskins. 1995, Philadelphia: WS Saunders.
69. Gunn-Moore, D. Techniques for neonatal resuscitation and critical care. in 31st World Small Animal Veterinary Congress. 2006. Prague, Czech Republic.
70. Kliegmann, R.M. and S. Morton, The metabolic response of the canine neonate to twenty-four hours of fasting. *Metabolism*, 1987. **36**: p. 521-526.
71. Atkins, C.E., Disorders of glucose homeostasis in neonatal and juvenile dogs: Hypoglycemia – Part I. *Comp Cont Educ Pract Vet*, 1984. **6**: p. 197-208.

72. Johnston, S.D., M.V.R. Kustritz, and P.N.S. Olson, *The Neonate - From Birth to Weaning*, in *Canine and Feline Theriogenology*. 2001, Saunders. p. 146 - 167.
73. Rosset, E., et al., Age-related changes in biochemical and hematologic variables in Borzoi and Beagle puppies from birth to 8 weeks. *Vet. Clin. Pathol.*, 2012. **41**: p. 272-282.
74. Ishii, T., et al., Background data for hematological and blood chemical examinations in juvenile beagles. *Exp Anim*, 2013. **62**(1): p. 1-7.
75. Knowles, T.G., et al., Changes in the blood biochemical and haematological profile of neonatal calves with age. *Veterinary record*, 2000. **147**: p. 593-598.
76. Ballotta, G., et al., Evaluation of glycaemia in newborn puppies right after birth born via C-section., in *First Symposium of the European College for Animal Reproduction (ECAR)*. 2019: Vienna.
77. Sharkey, L.C. and M.L. Wellman, Use of Lactate in Small Animal Clinical Practice. *Clin Lab Med*, 2015. **35**(3): p. 567-77.
78. Ferasin, L., et al., Evaluation of a portable lactate analyzer (Lactate Scout) in dogs. *Vet Clin Pathol*, 2007. **36**(1): p. 36-9.
79. McMichael, M.A., et al., *Serial plasma lactate concentrations in 68 puppies aged 4 to 80 days*. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 15(1) 2005, pp 17-21, 2005. **15**(1): p. 17-21.
80. Borruto, F., C. Comparetto, and A. Treisser, Prevention of cerebral palsy during labour: role of foetal lactate. *Arch Gynecol Obstet*, 2008. **278**(1): p. 17-22.
81. Wiberg-Itzel, E., et al., Determination of pH or lactate in fetal scalp blood in management of intrapartum fetal distress: randomized controlled multicentre trial. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 2008. **336**(7656): p. 1284-7.
82. Antończyk, A., M. Ochota, and W. Nizański, Umbilical Cord Blood Gas Parameters and Apgar Scoring in Assessment of New-Born Dogs Delivered by Cesarean Section. *Animals (Basel)*, 2021. **11**(3).
83. Borruto, F., et al., Screening of foetal distress by assessment of umbilical cord lactate. *Clin Experim Obstet Gynecol*, 2006. **33**(4): p. 219-22.

84. Cataldi, L. and V. Fanos, [Leonardo da Vinci and his studies on the human fetus and the placenta]. *Acta Biomed Ateneo Parmense*, 2000. **71 Suppl 1**: p. 405-6.
85. Rosenfeld, C.S., *Introduction to comparative placentation*, in *Comparative Reproduction Biology*, H. Schatten and G.M. Constantinescu, Editors. 2007, Blackwell. p. 263 - 270.
86. Mossman, H.W., Comparative morphogenesis of the fetal membranes and accessory uterine structures. *Carnegie Instit Contrib Embryol*, 1937. **26**.
87. Steven, D.H. and G. Morris, *Development of the foetal membranes*, in *Comparative Placentation*, D.H. Steven, Editor. 1975, Academic Press: New York. p. 214-267.
88. Anderson, J.W., Ultrastructure of the placenta and fetal membranes of the dog. I. The placental labyrinth. *Anat Rec*, 1969. **165**(1): p. 15-35.
89. Leiser, R. and B. Koob, Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat. *J Exp Zool*, 1993. **266**(6): p. 642-56.
90. Aralla, M., et al., Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term. *Res Vet Sci*, 2013. **95**(1): p. 15-22.
91. Vejlsted, M., *Comparative Placentation*, in *Essential of Domestic Animals Embriology*, P. Hyttel, F. Sinowatz, and M. Veilsted, Editors. 2010, Saunders Elsevier. p. 104-119.
92. McGeady, T.A., et al., *Forms of implantation and placetation*, in *Veterinary embriology*. 2006, Blackwell Publishing Ltd. p. 78-104.
93. Miglino, M.A., et al., The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes. *Theriogenology*, 2006. **66**(6-7): p. 1699-702.
94. Hafez, S., Comparative Placental Anatomy: Divergent Structures Serving a Common Purpose. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017. **145**: p. 1-28.
95. Barone, R., Feto e i suoi annessi, in *Anatomia comparata degli animali domestici*. 2003, Edagricole: Bologna. p. 413-560.

96. Prakash Telugu, B. and J. Green, *Comparative Placentation*, in *Comparative Reproductive Biology*, H.S.a.G.M. Constantinescu, Editor. 2007, Blackwell Publishing Ltd: Oxford, UK. p. 271-320.
97. Chavatte-Palmer, P. and A. Tarrade, Placentation in different mammalian species. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2016. **77**(2): p. 67-74.
98. Pere, M.C., Materno-foetal exchanges and utilisation of nutrients by the foetus: comparison between species. *Reprod Nutr Dev*, 2003. **43**: p. 1-15.
99. Veggetti, A., *Gli Annessi Embrionali*, in *Corso di embriologia*. 1982, Società editrice esculapio: Bologna. p. 61-101.
100. Chastant, S. and H. Mila, Passive immune transfer in puppies. *Anim Reprod Sci*, 2019. **207**: p. 162-170.
101. Carter, A.M. and A.M. Mess, The evolution of fetal membranes and placentation in carnivores and ungulates (Ferungulata). *Anim. Reprod.*, 2017. **14**(1): p. 124-135.
102. Harvey, W., *De Generatione Animalium*. 1651, London: Sydenham Society.
103. Barone, R., *Annessi fetali e placenta*, in *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, R. Barone, Editor. 2009, Edagricole: Milano. p. 453-498.
104. Sanin, L.H., et al., Relation between birth weight and placenta weight. *Biol Neonate*, 2001. **80**(2): p. 113-7.
105. Salafia, C.M., A.K. Charles, and E.M. Maas, *Placenta and Fetal Growth Restriction*. *Clinical obstetrics and Gynecology*, 2006. **49**(9): p. 236-256.
106. Panti, A.A., et al., The relationship between the weight of the placenta and birth weight of the neonate in a Nigerian Hospital. *Nigeria Medical Journal*, 2012. **53**(2): p. 80-84.
107. Roland, M.C., et al., Fetal growth versus birthweight: the role of placenta versus other determinants. *PLoS One*, 2012. **7**(6): p. e39324.
108. Vedmedovska, N., et al., Placental pathology in fetal growth restriction. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011. **155**(1): p. 36-40.

109. Leary, S.D., et al., Contribution of the Umbilical Cord and Membranes to Untrimmed Placental Weight. *Placenta*, 2003. **24**(2-3): p. 276-278.
110. Hayward, C.E., et al., Placental Adaptation: What Can We Learn from Birthweight:Placental Weight Ratio? *Frontiers in Physiology*, 2016. **7**.
111. Gallana, M., et al. Placental weight and its relationship with newborn puppy size measurements in bitches undergoing C-section. in *Proceedings of the 8th International Symposium on Canine and Feline Reproduction ISCFR*. 2016. Paris, France.
112. Ballotta, G., et al. Relationship between placenta, puppies APGAR score and glucose concentration at birth. in *ECAR first symposium*. 2019. Vienna, Austria.
113. Sarli, G., et al., Canine Placenta Histological Findings and Microvascular Density: The Histological Basis of a Negative Neonatal Outcome? *Animals*, 2021. **11**: p. 1418.
114. Smith, F.O., Challenges in small animal parturition - imin elective and emergency cesarian sections. *Theriogenology*, 2007. **68**: p. 348-352.
115. Beccaglia, M., et al., Determination of gestational time and prediction of parturition in dogs and cats: an update. *Reprod Domest Anim*, 2016. **51 Suppl 1**: p. 12-17.
116. Lopate, C., Gestational Aging and Determination of Parturition Date in the Bitch and Queen Using Ultrasonography and Radiography. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2018. **48**(4): p. 617-838.
117. Levy, X., et al., Elective Caesarean Operation in the Bitch Using Aglepristone Before the Pre-Partum Decline in Peripheral Progesterone Concentration. *Reproduction in domestic animals*, 2009. **44**(2): p. 182-184.
118. Borges, K.S., et al., Litter size at birth in purebred dogs - a retrospective study of 224 breeds. *Theriogenology*, 2011. **75**(5): p. 911-9.
119. Rahal, S.C., et al., Pectus excavatum in two littermate dogs. *Can Vet Journal*, 2008. **49**: p. 880-884.
120. Davidson, A.P., Neonatal resuscitation: improving the outcome. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2014. **44**(2): p. 191-204.

121. Mosier, J.E., *The puppy from birth to six weeks*. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice, 1978. **8**: p. 70-100.
122. Bueno, L.M.C., et al., Lactate concentration in bitch and canine neonates born through caesarean section. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 2012. **64**(6): p. 1442-1448.
123. Barroso, R.M.V., et al., A utilização do lactato como marcador biológico prognóstico. UNESC Rev., 2006. **9**: p. 157-172.
124. Straube, S., et al., Investigation of the association of Apgar score with maternal socio-economic and biological factors: an analysis of German perinatal statistics. Arch Gynecol Obstet, 2010. **282**(1): p. 135-141.
125. Cornelius, A.J., et al., Identifying risk factors for canine dystocia and stillbirths. Theriogenology, 2019. **128**: p. 201-206.
126. van der Weyden, G.C., et al., The intrauterine position of canine fetuses and their sequence of expulsion at birth. J Small Anim Pract, 1981. **22**(8): p. 503-510.
127. Antończyk, A., M. Ochota, and W. Nizański, Umbilical Cord Blood Gas Parameters and Apgar Scoring in Assessment of New-Born Dogs Delivered by Cesarean Section. Animals, 2021. **11**(3): p. 685.
128. Trangerud, C., et al., A longitudinal study on growth and growth variables in dogs of four large breeds raised in domestic environments. J. Anim. Sci., 2007. **85**(1): p. 76-83.
129. Rootwelt, V., et al., Postpartum deaths: piglet, placental, and umbilical characteristics. J Anim Sci, 2013. **91**(6): p. 2647-56.
130. Rootwelt, V., et al., Associations between intrapartum death and piglet, placental, and umbilical characteristics. J. Anim. Sci., 2012. **90**: p. 4289-4296.