

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Veterinarie**

Ciclo XXVIII

**Settore Concorsuale di afferenza:
07/H5 Cliniche chirurgica e ostetrica veterinaria**

**Settore Scientifico disciplinare:
VET/10 Clinica ostetrica e ginecologia veterinaria**

TITOLO DELLA TESI

**VALUTAZIONE CLINICA DELLA VITALITA' DEL
NEONATO E VALUTAZIONE ISTOLOGICA DELLA
PLACENTA NELLA SPECIE CANINA**

Presentata da:

Dr.ssa CAROLA CARTOLANO

Coordinatore Dottorato:

Prof. CARLO TAMANINI

Relatore:

Prof. DANIELE ZAMBELLI

Correlatore:

Dott. MARCO CUNTO

Esame finale anno 2016

Indice

	1
INTRODUZIONE	7
PARTE COMPILATIVA	
1 GRAVIDANZA	8
1.1 Fisiologia della gravidanza	8
1.2 Diagnosi di gravidanza e determinazione della data del parto	9
1.3 Metodi di diagnosi di gravidanza	10
1.4 Modificazioni fisiche legate allo stato di gravidanza	15
2 PARTO	16
2.1 Fisiologia del parto	16
2.2 Parto spontaneo	17
2.3 Cesareo programmato	19
2.4 Cesareo d'urgenza	19
3 ASSISTENZA E RIANIMAZIONE NEONATALE	21
3.1 Valutazione della vitalità neonatale	22
3.2 Metodo di valutazione neonatale APGAR	23
3.3 Cause di mortalità neonatale	26
3.4 Distocia e ipoglicemia	28
3.5 Distocia e ipocalcemia	29
3.6 Ipotermia del cucciolo	30
3.7 Ipoglicemia nel cucciolo	31
3.8 Disidratazione nel cucciolo	32
3.9 Sindrome da distress respiratorio (RDS) e ipossia neonatale	33
3.10 Lattatemia nel cucciolo	34
4 FISIOLOGIA DEL NEONATO	35
4.1 Apparato respiratorio	35
4.2 Apparato cardio-circolatorio	36
4.3 Apparato digerente	37
4.4 Apparato genito-urinario	39
4.5 Apparato muscolo-scheletrico	40
4.6 Sistema nervoso	40
5 LA PLACENTA DEL CANE	41
5.1 Classificazione	42
5.2 Impianto	42
5.3 Placentazione	45
5.4 Organo ematofago placentare	45
5.5 Morfologia placentare	46
5.6 ISTOLOGIA PLACENTARE	53
5.7 MODIFICAZIONI DELL'ASPETTO ISTOLOGICO PLACENTARE DURANTE LA GRAVIDANZA	55
5.8 Vascolarizzazione placentare	57
6 LESIONI VASCOLARI NELLA PLACENTA	59
6.1 Vasculopatie trombotiche fetali	59

6.2 Vasculopatie trombotiche non fetali	62
---	----

PARTE SPERIMENTALE

7 SCOPO DEL LAVORO	67
8 MATERIALE E METODI	67
9 RISULTATI	78
10 DISCUSSIONI	84
11 CONCLUSIONI	88
BIBLIOGRAFIA	93

PARTE COMPILATIVA

INTRODUZIONE

La valutazione della vitalità neonatale ha ricevuto in passato scarsa attenzione in medicina veterinaria. Solo di recente, l'elevato valore economico dei cuccioli di razza e il coinvolgimento emotivo dei proprietari nel processo della nascita, hanno comportato un crescente interesse verso la gravidanza e la valutazione della vitalità neonatale del cucciolo. A tale proposito la placenta si dimostra essere l'unico organo in grado di fornire informazioni su due pazienti, la madre e il conceptus, contemporaneamente (Lewis e Benirschke, 2007). La placenta viene definita infatti come “diario della vita intrauterina” (Redline 2008). Una seconda definizione, molto efficace e comunicativa, la indica come “*life-line*” (Ray 2010). Essa è un organo unico, transitorio e vitale per lo sviluppo dei feti. Le funzioni della placenta sono di scambio di sostanze nutritive e cataboliti, di produzione di ormoni, di trasferimento di immunoglobuline e di detossificazione, oltre ad azione di stabilizzazione meccanica e protezione del feto. Negli esseri umani, la proliferazione, la differenziazione e la morte cellulare sono le forze trainanti del processo di placentazione. Anomalie in ogni fase di questo sviluppo possono portare ad una funzione placentare alterata o patologica con conseguenti ripercussioni sulla gravidanza (Ray, 2010). In umana alcune malattie croniche che si verificano nella vita adulta sono almeno parzialmente determinate da processi che avvengono in utero (ictus, ipertensione e diabete non insulino dipendente). In medicina veterinaria, ed in particolare nella specie equina l'importanza della fase intrauterina è stata dimostrata come fattore determinante nelle prestazioni agonistiche dei cavalli adulti (Foote et al., 2012). La placenta resta un organo “trascurato” nelle altre specie di interesse veterinario. Lo scopo di questo studio è stato applicare, per la prima volta nella specie canina, la tecnica di analisi d'immagine (ImagJ) per la valutazione di alcuni aspetti istologici placentari, in particolare la microvascolarizzazione placentare. Questo studio si è prefisso anche lo scopo di andare a verificare se queste modificazioni placentari possano influenzare lo stato di salute del cucciolo, nonché mettere in relazione parametri clinici del neonato, quali Apgar score, temperatura, glicemia e lattatemia alla nascita e dopo due ore, tra di loro e con il tipo di parto svolto (spontaneo, cesareo d'urgenza e cesareo programmato).

1 GRAVIDANZA

1.1 Fisiologia della gravidanza

Per gravidanza si intende il periodo che intercorre dal concepimento al momento del parto (G.Maffeo, A. Galli 1998). La fase determinante per il mantenimento della gravidanza in tutte le specie è quello del riconoscimento materno dello stato gravidico. L'embrione, infatti, nell'organismo materno corre il rischio di essere riconosciuto come un corpo estraneo in quanto geneticamente differente dalla madre (G.Maffeo, A. Galli 1998).

La durata della gravidanza è variabile e legata a molteplici fattori. Uno dei fattori ambientali che influenzano la gravidanza è la temperatura: brusche diminuzioni di temperatura come improvvisi innalzamenti possono comportarsi come fattori stressanti e determinare l'innescio dei meccanismi del parto (G.Maffeo, A. Galli, 1998)

Nella gran parte delle specie poliotociche è stata riconosciuta una correlazione inversa fra il numero di feti e la durata della gravidanza (eccezione fatta per la scrofa e la coniglia) (G.Maffeo, A. Galli, 1998).

La cagna è un animale ad ovulazione spontanea, in cui la liberazione di oociti avviene 48 ore dopo il picco ematico dell'ormone luteizzante (LH), ormone che viene rilasciato dall'ipofisaria anteriore. La cagna ovula tra i 3 e i 15 oociti per volta. Perché gli oociti siano fertilizzabili occorrono ulteriori 48 ore per la loro maturazione (gli oociti non fertilizzati invece degenerano a partire dal sesto giorno post-ovulazione). Gli oociti vengono fertilizzati ad opera degli spermatozoi negli ovidotti e successivamente passano nelle corna uterine a partire dal 3°-4° giorno post-ovulazione. Gli embrioni, sotto forma di morule, si trovano nel segmento distale degli ovidotti dal 6° all' 8° giorni dopo l'ovulazione. Il loro passaggio nelle corna uterine avviene all'incirca all' 8° giorni dopo l'ovulazione quando sono divenute blastocisti. Nei successivi 3 giorni le blastocisti di 1 mm fluttuano nel corno uterino ipsilaterale, nei successivi 3 giorni le blastocisti di 2 mm fluttuano da un corno uterino all'altro. L'annidamento avviene nei 14-16 giorni post-ovulazione (Majolino, 2010). Il picco di

progesterone viene raggiunto a 3-4 settimane dall'ovulazione, con delle concentrazioni variabili da 30-40 ng/ml fino a 70 ng/ml, per poi diminuire lentamente fino a raggiungere il livello basale di 2 ng/ml 24 ore prima del parto o alla fine del diestro nel caso in cui non ci sia gravidanza. Le concentrazioni di estrogeni non differiscono tra la cagna gravida e quella non gravida. La fase luteinica nella cagna gravida dura circa 63 giorni dal giorno dell'ovulazione a quello del parto. Durante la seconda metà della fase luteinica la concentrazione di progesterone diminuisce e contemporaneamente vi è un aumento della concentrazione plasmatica della prolattina. Il ruolo della prolattina è quello di sostenere il corpo luteo. Inibire la secrezione di prolattina durante la seconda metà della gravidanza potrebbe esitare in un aborto in quanto il corpo luteo andrebbe in contro a lisi (Majolino, 2010).

Prima dell'impianto il sostentamento dell'embrione è prevalentemente legato alle secrezioni uterine specifiche del periodo diestro, dopo l'annidamento si creano invece rapporti diretti e indiretti materno-fetali (G.Maffeo, A. Galli 1998).

Dopo l'annidamento si viene a formare la placenta che nel cane è di tipo endotelio-coriale, cioè l'endometrio materno è a diretto contatto con l'allanto-corion fetale (Majolino, 2010). La placenta canina viene definita zonata in quanto ha una forma a fascia che ricopre interamente la circonferenza del lume uterino. Il sangue materno conferisce ai lati della placenta zonata un aspetto verdastro. Questo pigmento definito uteroverdina può rendersi evidente come perdite vaginali al termine della gravidanza stando a testimoniare un distacco placentare. Nel cane attraverso la placenta passa solo il 5-10 % delle immunoglobuline prodotte dalla madre, la restante parte è trasferita dalla madre al cucciolo con l'assunzione del colostro (Majolino, 2010).

1.2 Diagnosi di gravidanza e determinazione della data del parto

La durata della gestazione può essere calcolata in maniera precisa sui rilievi dell'esame colpocitologico (55-60 giorni dall'inizio del diestro citologico); del picco di LH (64-66 giorni dal picco di LH plasmatico); e dell'aumento preovulatorio del progesterone (62-66 giorni dall'aumento del progesterone plasmatico) (Veronesi, 2013). Di gran lunga più impreciso è il

calcolo della durata della gravidanza dal giorno dell'accoppiamento, in quanto se l'accoppiamento avviene prima dell'ovulazione può comunque dare esito ad una gravidanza, dal momento che gli spermatozoi di un cane fertile sopravvivono fino a 5-7 giorni nelle vie genitali femminili. Il risultato di un accoppiamento troppo precoce rispetto all'ovulazione si tradurrà quindi in una gravidanza che potrà durare anche 70 giorni. Un accoppiamento che avviene tardi rispetto all'ovulazione può comunque dare una gravidanza. Infatti, dopo l'ovulazione, gli oociti necessitano di 48 ore affinché possano essere fertilizzati. Gli oociti maturi rimangono attivi e potenzialmente fertilizzabili per altri 3 giorni. In questo caso la gravidanza avrà una durata più breve, anche di soli 58 giorni (Majolino, 2010).

Nel cane la previsione della data del parto è molto importante perché permette di programmare l'opportuna assistenza in caso di parto spontaneo, ma anche per l'induzione farmacologica del parto stesso o per l'esecuzione del taglio cesareo programmato al fine di prevenire le distocie tipiche di alcune razze a rischio (Brachicefali, Chihuahua, Bassotti, Pechinese, Barbone toy, Volpino di Pomerania, Yorkshire terrier) (Veronesi, 2013).

1.3 Metodi di diagnosi di gravidanza

L'esame ecografico è la tecnica diagnostica d'elezione in quanto non invasiva e sicura sia per l'operatore che per il paziente. Esistono tre tipi di ecografie descritte in letteratura ai fini della diagnosi di gravidanza: A-mode, Doppler e B-mode (quella più di gran lunga più usata). Le sonde utilizzate sono settoriali da 5 o 7,5 Mhz (Majolino 2010). Le strutture fetali e quelle circostanti possono essere visualizzate a partire dal 17° giorno di gestazione (Forsberg 2013). A partire dal 20° giorno di gestazione le camere gestazionali hanno un diametro di circa 7 mm e una lunghezza di 15 mm, l'embrione diventa ecograficamente rilevabile (Majolino 2010). Verso il 28° giorno di gestazione, l'embrione si discosta dalla parete endometriale e appare fluttuante nel lume uterino, delimitato dalle membrane fetali come il sacco vitellino che è caratterizzato da una struttura tubulare che si estende alla destra dell'embrione (Lopate 2012). Il periodo migliore è considerato il 25° giorno, ma è possibile effettuare l'esame già dal 19-20° giorno. Il battito cardiaco dell'embrione è rilevabile con uno strumento doppler a partire dal 24°-28° giorno di gravidanza (Forsberg

2013). La placenta risulta essere visibile intorno al 26°-27° giorno di gestazione come una struttura ben distinta che riveste l'utero in prossimità dell'embrione (Lopate 2012). I movimenti fetali sono visibili dal 35-36° giorno (Okkens et al., 1997).

L'ecografia transaddominale da 19-21 giorni dopo il picco di LH, costituisce un valido strumento non solo per l'accertamento della gravidanza ma anche per la previsione della data del parto mediante la misura delle strutture fetali ed extrafetali. La maggiore accuratezza della previsione della data del parto si ottiene con la misurazione ecografica del diametro interno della vescicola embrionale (cavità corionica) a partire da 25 giorni di gestazione e del diametro biparietale fetale a partire da 40 giorni; entrambi i parametri ben si correlano alla previsione della data del parto, con uno scarto di 1 giorno, soprattutto nelle cagne di piccola e media taglia (Veronesi, 2010). Nella cagna l'indice più importante è il diametro della cavità corionica o ICC (Inner diameter of the chorionic cavity) .Per misurarlo è necessario avere un'immagine di una vescicola embrionale quanto più sferica possibile , su questa si calcolano i diametri perpendicolari e si fa la media tra queste due misure. Tali misurazioni vanno ripetute su più vescicole facendo una media tra le misurazioni eseguite. Tale valore espresso in millimetri verrà applicato all'interno di un'equazione a seconda che la gagna sia di piccola o media taglia (Beccaglia et al., 2006; Luvoni et al., 2006) (Fig.1.1). Con il progredire della gravidanza si prende in considerazione anche il diametro biparietale o BPD (Biparietal Diameter) della testa del feto. Il solito valore espresso in millimetri verrà inserito in un'equazione specifica per cagne di piccola o media taglia (Beccaglia et al., 2006; Luvoni et al., 2006).

Rilievi in diagnosi precoce (prima metà della gravidanza)	
Strutture extra-fetali: diametro interno vescicola embrionale (ICC) in mm	
Cagna di piccola taglia < 10 Kg	Cagna di media taglia > 10 Kg; < 30 Kg
Giorni restanti al parto ± 1 : (ICC in mm – 68,68)/1,53	Giorni restanti al parto ± 1 : (ICC in mm – 82,13)/1,8
Rilievi in diagnosi più tardiva (seconda metà della gravidanza)	
Struttura fetale: diametro biparietale (BP) in mm	
Cagna di piccola tagli < 10 Kg	Cagna di media taglia > 10 Kg; < 30 Kg
Giorni restanti al parto ± 1 : (BP in mm – 25,11)/0,61	Giorni restanti al parto ± 1 : (BP in mm – 29,18)/0,7

Fig. 1.1 Calcoli per predire il giorno del parto partendo da rilievi ecografici fetali o extrafetali (Beccaglia et al., 2006; Luvoni et al., 2008).

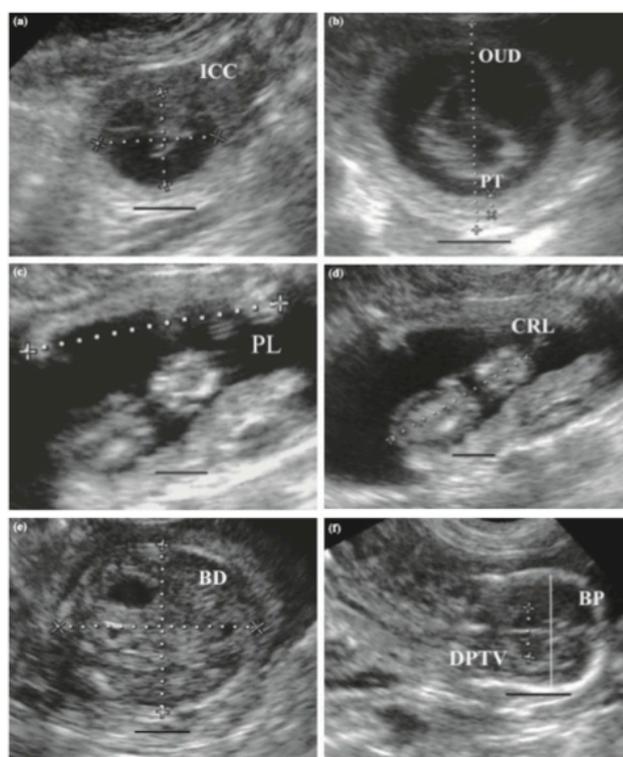


Fig. 1.2 I rilievi ecografici che possono essere acquisiti nel feto per determinare l'età gestazionale. A: diametro della cavità corionica (ICC); B: diametro interno della cavità uterina (OUD) e spessore placentare (PT); C: lunghezza placentare (PL); D: lunghezza fetale dalla nuca alle vertebre coccigee; E: diametro biparietale (BD); F: misura della vescicola telencefalica (DPTV) (Luvoni et al., 2006).

Altre misure che possono essere prese in considerazione per determinare l'età gestazionale sono : la lunghezza della placenta o PL(Placental Diameter), il diametro del corpo del feto o BD (Body Diameter), la distanza tra la nuca e le vertebre coccigee o CRL (Crown Rump Legth) (Beccaglia et al., 2006) e la misura della porzione profonda della vescicola telencefalica o DPTV (Deep Portion of Telencephalic Vesicle) (Beccaglia et al., 2008) (Fig.1.2).

La diagnosi ecografica ha un'attendibilità del 94-98% quando effettuata al 25° giorno di gestazione, tale attendibilità aumenta al 99% se effettuata al 28° giorno di gestazione (Toal et al., 1986; England et al ., 1990).

La diagnosi radiografica di gravidanza può essere effettuata al 40° giorno di gestazione, solo allora lo scheletro del feto diventa visibile. Tale strumento non ci consente di valutare la vitalità dei feti, ma ci permette di eseguire una diagnosi numerica e di posizionamento fetale (Forsberg 2013). Indicazione di morte fetale può essere il riscontro di gas all'interno del sacco amniotico o il collasso delle ossa craniche del feto (Toal et al., 1986).



Fig. 1.3 Diagnosi radiografica di gravidanza.

La diagnosi di gravidanza mediante palpazione trans-addominale risulta essere il metodo meno accurato e attendibile. E' effettuata tra il 24° e il 35° giorno di gravidanza, quando le vescicole embrionali, strutture sferiche e turgide, sono ancora separate le une dalle altre. Dopo tale termine tendono a confluire e non si avrà più la percezione di una "collana di rosario" tipica dell'utero gravidico in questa fase (Majolino, 2010). A tre settimane le camere gestazionali hanno un diametro di circa 15 mm, forma rotonda, consistenza dura e appaiono

ben distinte le une dalle altre, risultato pertanto palpabili nella parte alta dell'addome (Forsberg, 2013). Alla quarta settimana le camere gestazionali raggiungono un diametro di 25 mm ed una forma ovale, a causa del loro maggiore peso assumono una posizione centrale nell'addome. Alla quinta settimana le camere gestazionali raggiungono un diametro di 35 mm, appaiono più soffici a causa dell'aumento di liquidi fetali e non risultano più palpabili come strutture separate. Dopo la quinta settimana di gestazione la diagnosi di gravidanza mediante palpazione diviene al quanto difficile a causa dell'aumento dei liquidi fetali e delle stesse corna uterine (Forsberg, 2013)

1.4 Modificazioni fisiche legate allo stato di gravidanza

Nelle cagne gravide, anche dopo la fine dell'estro, permane una lieve edema vulvare, associato ad un modico aumento di volume dei capezzoli che si colorano di rosa dopo la terza settimana di gestazione. Durante questa, in corrispondenza dell'impianto degli embrioni, possono comparire anche sintomi quali anoressia e vomito presenti anche durante la quinta settimana, conseguente alla pressione esercitata dai corni uterini dilatati sullo stomaco e sul fegato (Forsberg, 2013). L'aumento di peso della gestante è rilevabile dal 35° giorno di gestazione, la quale può aumentare del 50% il suo peso iniziale in funzione della numerosità dei feti. L'aumento del diametro addominale è percepibile intorno al 40° giorno di gravidanza, ma dipende dalla taglia dello stato di nutrizione della madre. Il colostro inizia ad essere secreto dalle ghiandole mammarie nell'ultima settimana di gravidanza. Durante la gravidanza può ritenersi normale nella gestante una diminuzione dell'ematocrito (anemia normocromica e normocitica) e un moderato aumento dei leucociti. Vi sono valori durante la gravidanza che tendono fisiologicamente ad aumentare come la proteina c reattiva (PCR) e il fibrinogeno, ma che risultano al quanto aspecifici per essere utilizzati come indicatori precoci di gravidanza. La relaxina viene prodotta dalla placenta rilevabile a partire dal 25° giorno dall'ovulazione (Majolino, 2010). Tuttavia nessuna di queste modificazioni può essere presa in considerazione come parametro per una diagnosi di gravidanza di certezza (Majolino, 2010).

2 PARTO

2.1 Fisiologia del parto

Il parto segna la fine della gravidanza, momento in cui i feti divengono indipendenti per quanto concerne la circolazione e la respirazione. I cambiamenti endocrinologici che avvengono in questo periodo sono dovuti agli stadi finali della maturazione dell'unità fetoplacenta e sono anche responsabili della sincronizzazione delle funzioni della ghiandola mammaria, dell'involuzione dell'utero dopo il parto e del ripristino del ciclo ovarico. Il processo del parto pare sia determinato dalla maturazione e attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene del feto. È noto infatti che la rimozione dell'ipofisi anteriore o delle surrenali del feto causi un prolungamento del periodo di gestazione. (G.Maffeo, A. Galli, 1998). Alcuni giorni prima del parto, mentre nel feto si ha solo un aumento dei livelli plasmatici di cortisolo, nella madre aumenta la concentrazione di estrone, estradiolo, relaxina, cortisolo, ossitocina, PGF 2 alfa ed il suo metabolita. 24-36 ore prima del parto la sintesi di progesterone viene bloccata a causa della lisi del corpo luteo determinata dalla produzione e liberazione di luteolisine endogene (PGF 2 alfa). Si assiste contemporaneamente ad una diminuzione della temperatura rettale, di circa 1°C° nelle 12-6 ore prima dell'inizio del parto. Avendo il progesterone degli effetti ipertemici si suppone che questa ipotermia transitoria rappresenti un'incapacità temporanea di compensare la rapida discesa del progesterone. La diminuzione delle concentrazioni ematiche di progesterone è l'evento indispensabile affinché abbiano inizio tutti i meccanismi del parto. Il progesterone infatti inibisce la motilità uterina agendo sul potenziale di membrana e impedendo i processi di ripolarizzazione delle fibrocellule muscolari uterine. Venendo meno questo meccanismo inibitorio le PGF 2 alfa possono promuovere la motilità uterina, che interagendo con l'adenil-ciclastasi della muscolatura liscia, riducono i livelli di AMPc, favorendo quindi le contrazioni del miometrio. Inoltre l'aumento dei metaboliti della prostaglandine circolanti determinano il rilascio di ossitocina dalla neuroipofisi che agisce anch'essa sulla contrattilità del miometrio. Non è ancora chiaro se la prolattina incida sui meccanismi del parto, oppure abbia un ruolo di acceleratore di tale evento in quanto è stata notata la sua capacità di stimolare la secrezione di corticosteroidi fetali. Gli estrogeni inoltre sembrerebbero capaci

di aumentare il numero di recettori uterini per l'ossitocina, indispensabile nella fase espulsiva del parto (G.Maffeo, A. Galli , 1998). Benchè il parto sia preceduto da un calo di progesterone e da un aumento del livello dei metaboliti della PGF 2 alfa nel plasma materno, non è del tutto chiaro come questi cambiamenti ormonali siano attivati. Anche se spesso è stato detto che sono i feti stessi ad innescare il processo del parto, non vi è in bibliografia alcuna prova certa che ciò avvenga anche nel cane. Sebbene l'inerzia uterina sia la causa piu' frequente di distocia nel cane, non vi sono informazioni sui cambiamenti di espressione dei recettori per l'ossitocina e per le prostaglandine e sulla presenza di gap-junctions del miometrio. Benchè i livelli plasmatici di relaxina (prodotta principalmente dalla placenta) siano elevati durante la tarda gravidanza e il parto, rimane da chiarire il ruolo nella regolazione delle funzioni della cervice e del miometrio nella cagna. Anche se sono reperibili in commercio diversi dispositivi per registrare simultaneamente l'attività uterina e il battito cardiaco fetale durante il parto (tocodinamometri), questo tipo di apparecchiatura non è validato da adeguati studi di fisiologia. Anche se nella pratica veterinaria è comunemente utilizzata l'ossitocina sintetica per il trattamento dell'inerzia uterina , pochi studi hanno indagato i livelli plasmatici di ossitocina nelle cagne in gravidanza e durante il parto. Da questi studi è emerso che le concentrazioni di ossitocina nel plasma sono piu' elevate nella fase espulsiva rispetto alla durata dell'intera gravidanza. Tuttavia resta da indagare la relazione tra il modello di secrezione dell'ossitocina e la comparsa e l'evoluzione della contrattilità miometriale, nonché i tempi di espulsione e della successione dei cuccioli. In bibliografia è riportato che le cagne con distocia hanno livelli plasmatici di ossoiocina, di vasopressina, e di metaboliti di PGF 2 alfa più bassi (Veronesi, 2013).

2.2 Parto spontaneo

Il parto è l'insieme dei processi naturali per mezzo dei quali avviene l'espulsione del feto e degli annessi fetali. Il parto viene diviso in tre stadi. Il primo stadio , *Fase dilatativa*, è caratterizzato dalle contrazioni uterine inapparenti e dalla dilatazione cervicale. La sua durata va dalle 6 alle 12 ore. L'animale è più irrequieto, scava, rifiuta il cibo e la temperatura corporea scende (Majolino, 2010) .La relaxina, un ormone proteico prodotto dal corpo luteo

o dalla placenta è implicato insieme agli estrogeni e alle prostaglandine nella regolazione di questo processo (G.Maffeo, A.Galli, 1998). Il secondo stadio, *Fase espulsiva dei feti*, dura dalle 3 alle 6 ore ma può protrarsi oltre in caso di cucciolate numerose. Prima dell'espulsione del cucciolo può comparire il sacco allantoideo (Fig.2.1), una sacca piena di liquido trasparente. Dall'esterno è possibile rilevare le contrazioni dei muscoli addominali che accompagnano l'espulsione di ogni singolo feto. All'uscita il cucciolo è avvolto nel sacco amniotico che la madre romperà nel tentativo di liberare il cucciolo e stimolarne il primo atto respiratorio mediante il lambimento e recidendo il codone ombelicale con i denti. I cuccioli vengono partoriti mediamente ogni 20-60 minuti, una pausa superiore alle 4 ore tra l'espulsione di un cucciolo e l'altro deve destare all'erta (Majolino, 2010).



Fig. 2.1 Fase espulsiva del parto naturale

L'abbassamento della concentrazione ematica di relaxina al momento della fase espulsiva del parto è estremamente importante dal punto di vista funzionale, in quanto quest'ormone è considerato un inibitore secondario dell'attività miocinetica uterina, riduce cioè la frequenza delle contrazioni ma non la loro ampiezza (G.Maffeo, A.Galli, 1998). Il terzo stadio, comprende *l'espulsione delle membrane fetali*. I cuccioli possono essere partoriti con le

membrane intatte o attaccati semplicemente con il cordone ombelicale alla placenta che rimane nelle vie genitali della madre, in questo caso la placenta sarà espulsa successivamente (Majolino, 2010). Il normale comportamento materno comporta la rottura degli invogli fetali, il lambimento dei cuccioli, la morsicatura del cordone ombelicale e l'ingestione delle placente (G.Maffeo, A. Galli, 1998).

L'associazione dell'esame tocodinamico per il monitoraggio delle contrazioni uterine e dell'ecografia o del doppler per il monitoraggio della frequenza cardiaca fetale permette la migliore valutazione dell'evoluzione del parto, del grado di stress fetale e della risposta a eventuali terapie mediche. Tuttavia questi metodi comportano l'impiego di uno strumento piuttosto costoso e risulta quindi di limitato impiego nella pratica clinica (Veronesi, 2013).

2.3 Cesareo programmato

La scelta di programmare un'intervento cesareo scaturisce dall'esigenza di prevenire ed evitare complicazioni che potrebbero trasformare un parto naturale in un parto distocico con conseguente sofferenza fetale. Il metodo migliore per programmare un cesareo è l'identificazione del diestro citologico dopo l'accoppiamento, a cui segue il monitoraggio della gravidanza e l'eventuale induzione farmacologica del parto.

L'esecuzione anticipata del taglio cesareo potrebbe comportare la nascita di cuccioli non completamente maturi a rischio di mortalità neonatale. Il problema principale sembra l'inadeguata produzione di quali-quantitativa di surfactante polmonare. A tale riguardo è stata ipotizzata l'utilità della terapia con glucocorticoidi per accelerare la maturazione polmonare, già osservata in altre specie. I risultati in cuccioli nati da cagne trattate a fine gestazione con glucocorticoidi sono contraddittori sia in termine di efficacia nell'induzione della maturazione polmonare sia nei confronti di eventuali effetti collaterali, quali per esempio l'interferenza sull'assorbimenti di eventuali anticorpi colostrali (Veronesi, 2013).

2.4 Cesareo d'urgenza

Un parto è considerato normale quando la gestante non necessita di assistenza. La distocia è

invece definita come un parto difficile o l'impossibilità di espellere il cucciolo senza un'adeguata assistenza. L'incidenza di distocia nella cagna descritta in letteratura è di circa il 5% (Davidson, 2012). Sono conosciute cause di origine materna, fetale e combinate (Gaudet, 1985).

L'ecografia transaddominale permette di osservare i movimenti fetali e di valutare la frequenza cardiaca fetale. Nel cane, sebbene sia stata riportata una frequenza cardiaca fetale variabile tra 170 e 260 bpm, una sua riduzione a <200 bpm indica stress fetale con una prognosi di sopravvivenza riservata- infausta e richiede un intervento entro 2-3 ore. Se la frequenza cardiaca è inferiore a 160-180 bpm la prognosi è infausta a meno che non si intervenga nell'immediato. Secondo alcuni autori l'assenza di movimenti fetali sarebbe, indipendentemente dalla frequenza cardiaca, un indice prognostico negativo anche per la specie canina come per l'uomo (Veronesi , 2013)

In letteratura, gli studi condotti sugli effetti dei vari anestetici sulla sopravvivenza neonatale, hanno riportato che il propofol risulta essere un farmaci sicuro per l'induzione dell'anestesia generale nel taglio cesareo grazie al suo rapido metabolismo da parte del fegato (Ilkiw et al., 1992). Infatti nonostante oltrepassi la barriera placentare viene rapidamente eliminato dalla circolazione neonatale (Doebeli et al., 2013)

I risultati ottenuti sulla sopravvivenza neonatale, con l'applicazione di un protocollo anestesiológico che prevedeva l' induzione con propofol e mantenimento dell'anestesia con isofluorano, sembrano essere sovrapponibili a quelli ottenuti con l'utilizzo di anestesia epidurale (Moon et al., 2002). I neonati eliminano rapidamente anestetici inalatori con l'inizio della respirazione spontanea (Moon et al., 2000)

I cuccioli ottenuti da cesareo d' emergenza ,eseguito con anestesia per via endovenosa e gassosa, hanno mostrato scarsa risposta alla rianimazione rispetto ai cuccioli nati da cesareo programmato. Ciò è stato attribuito al loro maggiore stato di sofferenza fetale rispetto a quelli nati da cesareo programmato (Lucio et al., 2008).

3 ASSISTENZA E RIANIMAZIONE NEONATALE

Il parto si compie con successo quando la durata del primo e del secondo stadio è inferiore rispettivamente alle 6 e alle 12 ore (Veronesi , 2013). La mortalità neonatale è infatti direttamente correlata alla durata del secondo stadio del parto (Johnson & Casal , 2012). E' stato riportato che quando la durata del secondo stadio è inferiore alle 5 ore la mortalità neonatale è del 5,8%. Se il secondo stadio si protrae fino alle 24 ore la mortalità sale al 13% (Darvelied et al., 1994). Se alla fuoruscita di materiale nero-verdastro dalla vulva non fa seguito entro 3-4 ore la nascita di un cucciolo vuol dire che non siamo più nelle condizioni di normalità e che si rende necessario un intervento medico o chirurgico (Veronesi , 2013).

L'assistenza al neonato è differente a seconda che si tratti di parto eutocico, parto distocico o parto cesareo (Veronesi, 2013).

Nel caso del parto spontaneo , la madre dopo l'espulsione del feto rimuove gli invogli placentari, recide il cordone ombelicale e mediante il lambimento libera le vie aeree del cucciolo e stimola il riflesso cutaneo- respiratorio evocabile a livello della regione ombelicale e ano-genitale (Veronesi, 2013). Nel caso di mancato istinto materno da parte della gestante o in seguito ad intervento chirurgico di taglio cesareo è la persona che assiste al parto a dover recidere , nel più breve tempo possibile, gli invogli fetali e liberare il neonato (Johnson & Casal , 2012). Prima della recisione del cordone ombelicale è bene provvedere alla stimolazione del neonato eseguendo le azioni previste e sintetizzate dall'acronimo “ A, B, C, D” che sta per Airways, Breathing, Circulation, e Drugs. Quest'acronimo serve a ricordare la sequenza temporale delle azioni da eseguire nel corso della rianimazione neonatale. Questa deve iniziare con la liberazione delle vie aeree , proseguire con la stimolazione della respirazione e il controllo dell'attività cardiocircolatoria e solo se necessario, con il ricorso all'impiego di farmaci (Veronesi , 2013). Le vie aeree possono venire liberate per aspirazione mediante l'utilizzo di una pompetta, o una siringa priva di ago , facendo attenzione a non esercitare un'eccessiva pressione negativa , onde evitare lesioni delle vie aeree e una stimolazione vagale con conseguente bradicardia e laringospasmo (Johnson & Casal, 2012). Durante tale procedura è opportuno tenere la testa e il collo estesi, per favorire il deflusso dei liquidi polmonari si può mantenere il neonato leggermente inclinato in posizione caudo-craniale, per un tempo limitato onde evitare

compressione da parte degli organi addominali sul diaframma. E' solo dopo la liberazione delle vie aeree che si può procedere alla stimolazione del respiro, onde evitare l' inalazioni dei fluidi fetali (Veronesi , 2013), con conseguente aumento della quota di liquidi polmonari a dover essere riassorbita dal sistema linfatico (Linde et al., 2000). Il riflesso della respirazione può essere anche stimolato andando a frizionare delicatamente la regione genitale e ombelicale simulando il lambimento materno (Gundy, 2006). E' riportato anche la stimolazione del respiro mediante agopuntura. Il metodo prevede l' infissione di un ago in tonificazione in un punto situato sul rafe nasale definito Fen Shui (Acque divise), sul quale si trova il vaso governatore 26, la cui stimolazione causa la liberazione di epinefrina. Quando si evidenzia una buona respirazione è possibile, mediante clampatura o allacciatura con materiale di sutura, recidere il cordone ombelicale ad una distanza di due centimetri circa dall'ombelico (Trass, 2008). Una volta garantito il giusto apporto di ossigeno è estremamente importante riscaldare il neonato. E' importante che anche l'ambiente in cui vengono al mondo i cuccioli sia mantenuto ad una giusta temperatura, ovvero intorno ai 30 C° (Johnson & Casal, 2012). Se i cuccioli sono ipotermici difficilmente rispondono alle procedure di rianimazione. In condizioni di ipotermia il cucciolo si iberna, sopprimendo tutti i processi metabolici compresa la respirazione. L'ipotermia può quindi causare bradicardia, ileo, e andare a peggiorare l'ipoglicemia e lo stato di acidosi (Johnson & Casal, 2012).Tuttavia è fisiologico un drastico calo della temperatura corporea subito dopo la nascita. Il valore piu' basso di temperatura alla nascita è riportato si raggiunga dopo i primi 40 minuti di vita (Van der Weyden et al., 1989). Successivamente si assiste ad un graduale aumento della stessa , fino a raggiungere valori di 35 C° - 37, 2 C° ritenuti normali durante le prime settimane di vita (Lawler , 2008).

3.1 Valutazione della vitalità neonatale

Il cucciolo neonato è particolarmente vulnerabile a causa di quattro fattori fondamentali: il deficitario meccanismo di termoregolazione, il rischio di disidratazione e di ipoglicemia , e la carenza di difese immunitarie (Blunden, 1998). La definizione del periodo neonatale in medicina veterinaria è generalmente considerata la fase di transizione dal feto alla vita adulta (Jones, 1987). Papich e Davis (1986) hanno definito il periodo neonatale per il cane e il gatto

come i primi 30 - 45 giorni di vita. Trascorso questo periodo, i meccanismi di eliminazione, epatici e renali, del farmaco, sono simili a quelli dell'adulto. Il cucciolo neonato è un animale immaturo, dipendente dalla madre per la sopravvivenza nelle prime tre settimane di vita, di conseguenza la causa di morte precoce è spesso complessa e difficilmente determinabile (Chandler, 1990; Blunden, 1998). Fox (1963 e 1965) ha identificato nell'immatunità dei meccanismi cardiovascolari dei cuccioli appena nati, la probabile causa di morte per insufficienza cardiopolmonare. Prima di due settimane di vita il cuore non è sensibile alle atropina ciò indica l'immatunità del nervo vago. I barocettori non sono funzionali fino a quattro giorni dopo la nascita (Fox, 1965). La risposta polmonare risulta essere inadeguata nei cuccioli appena nati (Bright e Holmberg, 1990). L'immatunità dei meccanismi cardiovascolari può quindi essere causa di un circolo vizioso che causa una risposta inadeguata e irreversibile (Chandler, 1990). Un fattore importante che influenza la pressione media arteriosa del sangue (MABP) nel periodo perinatale è la concentrazione di glucosio nel sangue. Uno studio ha dimostrato una diminuzione di circa il 50% di MABP in cuccioli con grave ipoglicemia (Hernandez et al., 1980). Probabilmente a causa dei meccanismi di inibizione di contrattilità del miocardio e della muscolatura liscia vasale periferica. Si desume che è indispensabile quindi la precoce identificazione di segni di sofferenza fetale e dei neonati disvitali. In umana il livello di lattato ematico fetale rappresenta un indicatore oggettivo di sofferenza fetale ed è un fattore predittivo della sopravvivenza del bambino. Nella specie canina la tocodinamomentria (Davidson 2001) e la misurazione del lattato dalla vena ombelicale (Groppetti et al., 2010) forniscono preziose informazioni sulla sofferenza fetale e neonatale, ma richiedono purtroppo un supporto tecnico e un'adeguata esperienza per l'interpretazione dei risultati.

3.2 Metodo di valutazione neonatale APGAR

Il momento più critico per ogni neonato è il parto e l'inizio della respirazione autonoma. La pronta identificazione dei neonati meno vitali è indispensabile per adottare le dovute precauzioni. In medicina umana, nel 1952 l'anestesista Virginia Apgar (Fig.3.1), resasi conto della frequente mortalità neonatale nei bambini a causa della mancata identificazione del

grado di ridotta vitalità, ideò un metodo semplice, ripetibile ed effettuabile senza particolari strumenti ed in qualsiasi situazione, per la valutazione sistemica dei neonati (Veronesi, 2013).



Fig 3.1 Virginia Apgar ideatrice del metodo di valutazione neonatale Apgar

Questo metodo eseguito entro 5 minuti dalla nascita si basa sulla valutazione a punteggi (da zero a due) di cinque parametri : colore della cute, frequenza cardiaca, riflesso di irritabilità , attività motoria e respirazione. Ciò permette la classificazione dei neonati in tre categorie: neonati gravemente depressi, con punteggio da 0 a 3 ; neonati moderatamente depressi, con punteggio da 4 a 6; neonati normali con punteggio tra 7 e 10 (Veronesi, 2010). Nel 1963 il cognome della sua ideatrice divenne l'acronimo per la rapida memorizzazione dei 5 parametri da valutare : Appearance (colore della cute), Pulse (frequenza cardiaca), Grimace (reattività del neonato), Attitude (attività motoria) e Respiration (frequenza e caratteri del respiro). Il punteggio Apgar si è dimostrato essere un indice di diagnosi di sopravvivenza più attendibile della determinazione del peso corporeo alla nascita (in bambini nati con peso corporeo molto basso) e delle indicazioni fornite dall' emogas-analisi eseguito su sangue arterioso ombelicale. Tale metodo ha suscitato notevole interesse anche in medicina veterinaria trovando subito applicazione nel puledro, nel vitello e nel suinetto, forse per un maggior valore zootecnico. Per la sua applicazione nella specie canina si è dovuto attendere il 2009 , quando Veronesi e i suoi collaboratori hanno proposto uno schema di valutazione a punteggio tenendo conto dei seguenti parametri: Appearance, colore delle mucose; Pulse, frequenza cardiaca; , Grimace, irritabilità; Attitude, attività motoria; Respiration, respirazione (Fig 3.2). Per la valutazione

del colore delle mucose, della frequenza cardiaca, della frequenza respiratoria e della motilità gli autori hanno fatto riferimento ai dati presenti in bibliografia; per il riflesso di irritabilità è stato valutato in base alla loro esperienza sul grado di reazione del neonato alla delicata compressione dell'estremità di un arto: vocalizzazione sonora e rapida retrazione (punti 2), lievi vocalizzazioni e retrazioni dell'arto (punti 1) e assenza di vocalizzazioni e retrazione (punti 0).

A Apparence (colore delle mucose)	0 cianotiche 1 pallide 2 rosa
P Pulse (frequenza cardiaca)	0 < 180 bpm 1 180-220 bpm 2 > 220 bpm
G Grimace (irritabilità)	0 movimenti assenti 1 lieve reattività 2 normale reattività
A Attitude (attività motoria)	0 movimenti assenti 1 alcuni movimenti 2 movimenti attivi
R Respiration (respirazione)	0 vocalismi assenti < 6 rpm 1 lievi vocalismi 6-15 rpm 2 vocalizzazioni sonore > 15 rpm

Fig. 3.2 Metodo di valutazione neonatale Apgar adattato alle specie di interesse veterinario (Veronesi et al., 2009).

Il calcolo del punteggio totale ha dato luogo a 3 classi di vitalità neonatale (Fig. 3.3): cuccioli normalmente vitali da 10 a 7 punti, moderatamente depressi tra 6 e 4, gravemente depressi tra e 0.

Gravemente depressi	0-3 punti
Moderatamente depressi	4-6 punti
Normale	7-10 punti

Fig. 3.3 Classi di vitalità neonatale secondo l'applicazione del metodo Apgar (Veronesi et al.,2009)

Nel loro studio i cuccioli con punteggio compreso tra 0 e 6 sono stati sottoposti a rianimazione avanzata e le percentuali di successo sono state del 43% nei cuccioli gravemente depressi e 88% nei cuccioli moderatamente depressi. La mortalità a 2 e 24 ore è risultata essere dello 0% nei cuccioli con punteggio tra 7 e 10, del 12% nei cuccioli con punteggio tra 4 e 6 , e del 57% nei neonati con Apgar compreso tra 0 e 3 (Veronesi et al., 2009). Lo studio ha quindi dimostrato non solo l'applicabilità del metodo , ma anche che la pronta identificazione di neonati non vitali da sottoporre a rianimazione avanzata puo' ottenere un buon successo (Veronesi, 2010). Il punteggio Apgar sembra non essere influenzato dal tipo di parto e dall'ordine di nascita (Veronesi et al, 2009).

3.3 Cause di mortalità neonatale

La mortalità perinatale è definita in medicina umana come nati morti e morti che si verificano nella prima settimana di vita (Farquhar et al., 1974). Il concetto di mortalità perinatale dipende dal fatto che la maggior parte dei neonati che muoiono lo fanno come conseguenza diretta o indiretta di fattori presenti prima o durante il parto. I morti precocemente possono quindi essere aggiunti ai nati morti per dare una misura della perdita fetale totale (Baird e

Thomson, 1969). La mortalità dei cuccioli durante il parto e il periodo neonatale è un problema clinico rilevante, tuttavia è scarsamente documentata in medicina veterinaria. Si parla di tassi di mortalità che oscillano dal 10 al 30% nel periodo dello svezzamento (Lawler, 1989) e del 15-40% nelle prime 12 settimane di vita (Sturgess, 1998). Il 65% delle perdite si concentravano nella prima settimana di vita e riguardavano appunto i nati morti, che costituivano circa la metà di questi decessi, e i cuccioli morti entro 7 giorni (Lawler, 1989). Gli studi pubblicati sulla mortalità neonatale sono prevalentemente tre, quello di Anderson (1957), Potkay e Bacher (1977), e Blunder (1986). Tuttavia un confronto tra questi studi è di difficile esecuzione, in quanto nei primi due non sono state fornite informazioni sulla storia clinica né tantomeno descritti programmi di assistenza al parto e informazioni inerenti il monitoraggio dei cuccioli successivamente a questo. Nello studio di Blunden tutto ciò non viene specificato. Nella specie canina è riportato un elevato tasso di mortalità neonatale, tale tasso oscilla dal 17% al 40% durante le prime 8 settimane, ed è stato osservato che i nati morti e i morti entro la prima settimana di età rappresentano la maggior parte di questi decessi (Veronesi, 2013). Il tasso di mortalità per malattie nei cuccioli è, esclusi i nati morti, più alto durante i primi giorni di vita (Paffenbarger et al 1990; Moon et al 2001..). E varia in letteratura tra il 11,9% e il 34% (Mosier 1981). Tra le cause non infettive di mortalità neonatale è menzionata la Sindrome da distress respiratorio (RDS), l'ipossia, l'ipoglicemia, l'ipotermia, l'ipoglicemia e la disidratazione. L'ipotermia, l'ipoglicemia e la disidratazione sembrano essere anche coinvolte in malattie come la sepsi e le infezioni batteriche. In fondo le malattie primariamente non infettive predispongono ad infezioni successive (Fisher 1982; Farstad 2003). Le prime 24 ore dopo la nascita sembrano essere il periodo più critico, tale mortalità è strettamente legata alle modalità del parto e alla necessità o meno di un intervento ostetrico (Javakumar et al., 2015). Per il neonato, la fase più critica è costituita dal lavoro che deve compiere nei primi minuti dopo la nascita (Indrebo et al., 2007). In bibliografia (Lawler 1989) è riportato che la distocia, con conseguente ipossia o anossia è tra le prime cause di morte neonatale. Al contrario le malattie infettive rappresentano solo una piccola percentuale di questi decessi. La natura del parto ha un'incidenza sostanziale sulla mortalità neonatale canina e diversi studi hanno documentato un aumento della mortalità neonatale in seguito a parti complicati (Davidson 2012; Gaudet 1985). Le malattie infettive, in sostanza batterica, sono la seconda causa più importante di mortalità (Nielen et al. 1998) dopo le perdite legate al

parto. L'esame necroscopico dei cuccioli deceduti durante e poco dopo la nascita ha identificato nell'asfissia neonatale la principale causa di morte. Inoltre studi effettuati su feti di cane durante le ultime tre settimane di gravidanza per indagare l'effetto dell'ipossia indotta dalla compressione dell'aorta addominale materna, sulla frequenza cardiaca fetale, sui tessuti e sui livelli ematici di pH, pO₂ e pCO₂, hanno permesso di evidenziare che dopo alcuni secondi dall'inizio della compressione si assisteva ad una drastica riduzione della frequenza cardiaca fetale. Ciò costituisce un segno precoce di ipossia fetale (Veronesi, 2013). Come in altre specie, l'ossigenazione del feto nel cane durante il parto è compromessa da tre principali fattori: il ridotto flusso ematico dell'utero e della componente materna della placenta durante le contrazioni miometriali; il distacco della placenta zonata dalla parete uterina; la trazione del cordone ombelicale. Il cordone ombelicale dei cuccioli è piuttosto breve, rappresenta il 15% della sua lunghezza, così che subisce una trazione durante la progressione del feto nel canale del parto. Lo stiramento provoca vasocostrizione dei vasi ombelicali e riduce l'ossigenazione. Nonostante la trazione il cordone di solito è abbastanza resistente da rimanere intatto e la placenta viene espulsa insieme o poco dopo il cucciolo. A causa di questi meccanismi del parto non è sorprendente che anche nei parti eutocici i cuccioli nascano in un moderato o grave stato di acidosi mista respiratoria-metabolica. La maggior parte dei cuccioli, anche quelli con grave acidosi, ristabilisce un normale equilibrio acido base entro 3 ore dopo la nascita. Il livello elevato di glicogeno immagazzinato nei tessuti fetali, in particolare nei muscoli e nel cuore, durante l'ultima parte della gravidanza, e la temporanea riduzione post natale della temperatura corporea, sono i due principali fattori responsabili dell'elevata resistenza dei cuccioli all'asfissia durante il parto, permettendo una sorta di ibernazione fetale temporanea. Le concentrazioni di lattato nel sangue prelevato dal cordone ombelicale subito dopo il parto sono correlate con le caratteristiche del parto: più tempo trascorre tra due espulsioni consecutive maggiore è la concentrazione. In generale con un intervallo inferiore ad 1 ora e 45 minuti, i livelli di lattato rimangono inferiori a 5 mmol/L. (Veronesi, 2013).

3.4 Distocia e ipoglicemia

L'ipoglicemia è stata considerata una delle principali cause di distocia, in quanto correlata

all'inerzia uterina (Javakumar et al., 2015). In un recente studio che ha valutato l'efficacia degli interventi ostetrici sulla vitalità neonatale nel cane, l'86,96% delle partorienti risultavano essere normoglicemiche, inoltre la concentrazione di glucosio nel sangue di cagne che presentavano distocia era sovrapponibile a quelle che partorivano spontaneamente. I risultati di questo studio sono in accordo con altri dati presenti in letteratura (Linde et al., 2000; Bergstrom et al., 2006; Vibha 2012). Ciò spiegherebbe il motivo per cui molti casi di distocia, in particolare i casi di inerzia uterina, non rispondono alla somministrazione di routine di destrosio. In bibliografia (Bergstrom et al., 2006; Vibha 2012). E' addirittura riportato che alcune cagne che presentavano distocia risultavano essere iperglicemiche piuttosto che ipoglicemiche. È molto probabile che in questi animali il protrarsi del lavoro del parto causi una condizione di stress e quindi un maggior rilascio di cortisolo di cui è ben noto l'effetto iperglicemizzante. A sostegno di questa affermazione vi è l'osservazione fatta in letteratura (Olsson et al., 2003), secondo la quale si registra un aumento delle concentrazioni di cortisolo in animali che presentavano distocia. L'assenza di una chiara evidenza di iperglicemia in tutti gli animali affetti da distocia è probabilmente correlato al grado di stress, alla durata del parto e al grado di ansia. Infatti ad una condizione di iperglicemia che si manifesta durante una distocia segue il controllo endocrino attraverso il rilascio di insulina che mantiene lo status normoglicemico (Lucio et al., 2008).

3.5 Distocia e ipocalcemia

Anche l'ipocalcemia è stata per lungo tempo considerata una delle principali cause di distocia. Nello studio condotto nel 2015 (Jayakumar 2015) cani che presentavano distocia risultavano essere normocalcemici, proprio come sostenevano alcune fonti bibliografiche (Bergstrom et al., 2006; Vibha 2012). In letteratura (Jackson 1995; Kraus et al., 1990) è riportato che le concentrazioni sieriche di calcio in femmine che presentavano inerzia uterina erano del tutto sovrapponibili a quelle riscontrate in cagne con normali contrazioni miometriali. Fare una diagnosi di ipocalcemia resta comunque difficile in quanto è necessario poter misurare il calcio ionizzato.

3.6 Ipotermia del cucciolo

Durante la nascita il cucciolo viene alla luce in un ambiente con una temperatura inferiore a quella in cui ha vissuto nella vita intrauterina. La sua temperatura corporea precipita durante i primi 20 minuti, anche perché il cucciolo al momento della nascita è bagnato. Pertanto il grado di ipotermia dipende da questi fattori, e dalla velocità con cui la madre lo asciuga e lo mette a contatto con le mammelle per riscaldarlo. Il cucciolo alla nascita si comporta come un organismo omeotermo, a causa della mancanza dei meccanismi di termogenesi acquista calore per conduzione, mancano in lui infatti il riflesso del brivido e il meccanismo di vasocostrizione (Crighton 1969). La caduta iniziale della temperatura corporea subito dopo la nascita (inferiore a 30 ° C in alcuni casi) sembra essere però una valida protezione contro il danno ipossico. Infatti il tempo di sopravvivenza aumenta se il metabolismo si abbassa (Mott 1961).

La temperatura corporea tende a risalire normalmente entro le prime ore con l'istaurarsi del meccanismo della respirazione. La caduta iniziale della temperatura e un suo successivo graduale aumento è un processo fisiologico (Crighton 1969; Mosier 1978). Un cucciolo sano, nelle prime 24 ore, ha una temperatura corporea di 35-36,5° C. Essi non sono in grado (Fox 1966) di rabbrivire e presentano poco grasso bruno (Ashwell et al., 1987). Con il calo della temperatura, la frequenza cardiaca tende a diminuire :200-250 bpm a 35.6 ° C; 40-50 bpm a 21,1 ° C (Crighton 1969; Gunn-Moore 2006b). Inoltre, ad una temperatura <35 ° C i cuccioli perdono il riflesso della suzione, smettono di alimentarsi, si disidratano, e vanno in contro ad ileo paralitico (Fisher 1982), nonché sviluppano una maggiore suscettibilità alle infezioni virali e batteriche (es. Herpes virus canis). Se un cucciolo ipotermico è costretto ad alimentarsi può sviluppare gravi fermentazioni intestinali con traslocazione batterica nel torrente ematico, rigurgito e conseguente polmonite ab ingestis. Pertanto l'alimentazione assistita mediante sondaggio gastrico è indicata solo per cuccioli che abbiano una temperatura superiore a 35° C. Se i cuccioli vivono con la madre la temperatura ambiente consigliata è di 20-24° C. Nel caso di cuccioli orfani o separati dalla madre la temperatura consigliata durante la prima settimana è di 29-32 ° C, e di 26 ° C nella seconda settimana (Monson 1987). La temperatura dovrebbe essere gradualmente ridotta, dalla nascita fino alla fine del primo mese (Mosier 1978). Nell'ambito del nido i cuccioli dovrebbero sempre essere sempre nelle

condizioni di poter scegliere una zona con la temperatura più confortevole. Al contrario, esponendo cuccioli neonatali fino a 48 h di età, a temperature ambientali elevate viene depressa la respirazione, contrariamente a quanto avviene negli adulti. Questo suggerisce che un ambiente surriscaldato può predisporre i cuccioli appena nati per insufficienza respiratoria. L'esposizione dei neonati alle alte temperature ambientali "costanti" di solito porta a costipazione di tutti i cuccioli della cucciolata causa della loro disidratazione (Gunn-Moore 2006b).

3.7 Ipoglicemia nel cucciolo

Alla nascita, e per le prime 24 ore, il neonato fa affidamento per la propria sopravvivenza esclusivamente alle proprie riserve di glicogeno epatico. Tali riserve, a causa della malnutrizione intrauterina associata ad una gravidanza numerosa o alla malnutrizione materna, possono essere molto basse al momento della nascita. Entro le 8-12 ore dalla nascita il glicogeno epatico subisce glicogenolisi e il neonato a questo punto è costretto per forza a nutrirsi. È questo il momento più critico a rischio di insorgenza di ipoglicemia (Center et al., 1995). I neonati sono metabolicamente meno in grado di generare glucosio rispetto agli adulti, pur avendone un fabbisogno maggiore (Gunn-Moore 2006a). Durante il digiuno, le riserve di glicogeno diminuiscono rapidamente (Miettinen 1981). Queste riserve sono in grado però di mantenere i livelli di glucosio stabili nel sangue per 24 ore circa in caso di digiuno dopo la nascita (Kliegmann e Morton 1987). I cuccioli devono ricevere un supplemento alimentare se, nelle prime 24 ore, perdono più del 10% del loro peso alla nascita, o se il loro peso alla nascita è il 25% in media rispetto alla media di razza. Particolarmente rischiosa è anche la sovralimentazione, causa comune di diarrea non infettiva nei cuccioli rimasti orfani durante le prime 3 settimane di vita (Mosier 1978). Il colore e la consistenza delle feci possono avere a tal proposito un valore diagnostico: il colore cambia da verde per la presenza di secrezioni biliari a bianche che suggerisce la carenza di enzimi digestivi (Mosier 1978). Disturbi come sepsi (Young et al 1983.), Shunt porto (Atkins 1984) e le carenze degli enzimi epatici (Bardens 1966; Chastain 2001) possono causare una diminuzione della concentrazione di glucosio nel sangue. I segni clinici includono letargia, ottundimento del sensorio, depressione, convulsioni, tremori, vocalismi e la fame intensa (Atkins 1984). Livelli di glucosio nel sangue

inferiore a 1,6 mm (28,8 mg / dl) in cuccioli appena nati fino a 2 settimane di età dovrebbe essere considerato patologico, soprattutto se accompagnata da sintomatologia clinica (Atkins 1984). Il range normale per i livelli di glucosio nel sangue, nella prima settimana di vita, varia da 2,9 a 7,1 mm (52-127 mg / dl). La misurazione della glicemia avviene in maniera abbastanza agevole mediante l'utilizzo di glucometri e prelevando una gocciolina di sangue dall'orecchio o dal polpastrello del cucciolo. Le condizioni di ipoglicemia devono essere prontamente trattate. La mucosa orale è anche in grado di riassorbire soluzione di glucosio (10 o 20%) in modo rapido. Il fabbisogno calorico del cucciolo nella prima settimana è stato stimato intorno a 120 kcal / kg al giorno (Mosier 1981). Tuttavia condizioni di iperglicemia possono causare diuresi osmotica e conseguente disidratazione (Boothe e Tannert 1992).

3.8 Disidratazione nel cucciolo

I neonati sono predisposti alla disidratazione a causa di 4 fattori principali: l'aumento del liquido extracellulare, il rapporto tra superficie corporea e peso, l'capacità renale di trattenere l'acqua, e la maggiore perdita di liquidi attraverso la pelle immatura (Boothe e Tannert 1992). La diarrea, le malattie che causano shock, l'alimentazione insufficiente e l'esposizione alle alte temperature ambientali possono predisporre a gravi stati di disidratazione. L'ipotensione causata dall' ipokaliemia predispone i cuccioli a questa giovane età ad emorragia intracranica (Turberville et al. 1976) e / o insufficienza cardiaca congestizia (Coulter 1985). I neonati infatti non tollerano bene le variazioni o il sovraccarico di volume, iperosmolarità aumenterebbe anche il rischio di emorragia intracranica derivante dalla perdita di acqua nel cervello (Arant e Gooch 1979; Coulter 1985). Il grado di idratazione delle mucose, l'enofalmo e il colore delle urine sono di grande aiuto per valutare lo stato di idratazione del neonato, tenendo conto che il peso specifico urinario in questi soggetti varia da 1006 a 1017 nella prima settimana di vita (Engelstad 1982; Crawford 1995). Un peso specifico superiore a 1017 indica uno stato di disidratazione nei cuccioli neonati. La prova della plica cutanea non è affidabile a causa della maggiore presenza di acqua e la scarsità di grasso presente nella pelle (Macintire 1999). Nei pazienti neonatali il fabbisogno di liquidi è maggiore rispetto agli adulti (Boothe e Tannert 1992). Il fabbisogno giornaliero è stimato intorno ai 60-180 ml / kg (Mosier 1981) a seconda del grado di disidratazione.

3.9 Sindrome da distress respiratorio (RDS) e ipossia neonatale

Condizioni particolari durante l'espulsione del feto con conseguente ipossia e distress respiratorio è la causa del 60% dei decessi neonatali (Gunn-Moore 2006a; Münnich 2008). I cuccioli nati con presentazione podalica sembrano avere una acidosi più pronunciata rispetto a quelli nati con presentazione anteriore (van der Weyden et al. 1989). La distocia, nonché le procedure ostetriche come il taglio cesareo e l'anestesia nella cagna possono causare sofferenza fetale (Moon et al 2000; Moon-Massat e Erb 2002; Davidson 2006). La morte dei neonati conseguente a ipossia è condizionata da diversi fattori: la razza (intesa come dimensioni), la causa della distocia (inerzia, presentazione e posizionamento), la durata delle contrazioni senza successo (se superiore a 6 ore), la somministrazione di ossitocina la sua frequenza (Münnich e Küchenmeister 2009). In condizioni di ipossia lieve i neonati sono in grado di ridistribuire il flusso ematico agli organi vitali, cuore, cervello, diaframma e ghiandole surrenali, allontanandolo dalla milza, dall'intestino, dalla pelle ed dai reni. Ne consegue che in un grado di ipossia grave, con il fallimento della reidistribuzione del flusso ematico, si assisterà ad un calo della frequenza cardiaca e ad un aumento della motilità (Zone e Wanke 2001; Davidson 2006). La sindrome da stress respiratorio neonatale è definita anche come l'insufficiente produzione di surfattante polmonare o immaturità strutturale, caratteristica dei neonati pretermine. In medicina umana, il modo più efficace per evitare che tale sindrome è la corticoterapia prenatale, nel tentativo di indurre la produzione di tensioattivo in locus. Durante la fase finale della gravidanza canina, il polmone fetale evolve progressivamente ad una fase sacculare di sviluppo, caratterizzata da un aumento della superficie di scambio di gas e produzione iniziale di tensioattivo (Sipriani et al., 2009). Tuttavia, il trattamento con betametasona prenatale in cagne gravide al 55° giorni di gestazione porta a cambiamenti strutturali del parenchima polmonare, ma non un aumento della produzione surfattante polmonare (Ragazzi et al., 2011). Quindi la somministrazione di betametasona alla madre nella fase prenatale aumenta le aree di scambio gassoso, favorendo così i meccanismi di compensazione di squilibrio acido-base nei neonati pretermine. In uno lavoro condotto sullo studio radiografico del torace di alcuni cuccioli (Silvia et al., 2009), il 17% di cuccioli eutocici ha mostrato da moderata ad alterazioni polmonari di varia entità, in particolare rappresentate da radiopacità diffusa o localizzata del parenchima polmonare,

compatibile con la raccolta di liquidi. Subito dopo la nascita, infatti, i cuccioli presentano un quadro emogas-analitico di acidosi mista, con pH del sangue basso ed alte concentrazioni di anidride carbonica, ciò nonostante un buon punteggio Apgar (Lucio et al., 2009). Un periodo di un'ora è sufficiente ai neonati canini per ottenere un punteggio Apgar ideale, nonostante, uno squilibrio emogas analitico persistente. La somministrazione di ossitocina per atonia/ipotonia uterina, ha un effetto iperglicemizzante neonatale, nonché un grave effetto deletereo sulla condizione di acidosi del neonato (Lucio et al., 2009). Alla nascita, il 75% dei neonati canini presenta alterazioni del respiro e il 30% di questi mostra cianosi delle mucose (Silvia et al., 2009).

3.10 Lattatemia nel cucciolo

La misura del lattato dalla vena ombelicale può fornire buone informazioni cliniche sullo stato di sofferenza fetale (Groppetti et al., 2010). Gli autori hanno indicato come valore cut-off 5 mmol/L, permettendo così di distinguere cuccioli sani da cuccioli in difficoltà. Il lattato è un prodotto della glicolisi anaerobia che viene solitamente prodotto in condizioni di ridotta ossigenazione tissutale. Può anche venire prodotto, in basse concentrazioni, durante il metabolismo aerobico. La concentrazione di lattato è variabile. Nel cucciolo neonato (con meno di 4 giorni), la concentrazione si aggira intorno ai $3,83 \pm 1,38$ mmol/L. In seguito il valore si abbassa, fino a raggiungere la concentrazione normale dell'adulto (Pang et al., 2007). Tutto il lattato che viene prodotto deriva dal piruvato che si viene a formare normalmente durante il processo di glicolisi (Gauthier et al., 2002). Questa reazione è catalizzata da un enzima che è la lattato deidrogenasi. In condizioni di corretta ossigenazione, la maggior parte del piruvato che si viene a formare entra all'interno del mitocondrio e subisce una decarbossilazione ossidativa. La decarbossilazione ossidativa porta poi alla produzione di CO_2 , H_2O e allo sviluppo di 30÷36 molecole di ATP (Stryler, 1995). In condizioni di anaerobiosi, compresi gli stati di ipoperfusione placentare e tissutale, in linea generale, la produzione di energia passa per il metabolismo del piruvato che porta alla formazione del lattato e dell'acqua (Pang et al., 2007). La quantità di lattato che viene prodotta in condizioni normali, in genere, viene consumato primariamente dal fegato e dal rene (Cohen et al., 1976; Medias, 1986). All'interno di questi organi, il lattato è di nuovo convertito in piruvato, grazie

all'enzima lattato deidrogenasi, e da qui il piruvato rientra all'interno del metabolismo ossidativo (o ciclo di Krebs) o nel processo di gluconeogenesi (o ciclo di Cori) (Pang et al., 2007). Nel neonato si è visto come la concentrazione ematica di lattati sia sostanzialmente più elevata che nella madre. Tale concentrazione viene utilizzata come un indicatore sensibile di distress fetale al momento del parto (Sparks et al., 1982). Da studi condotti su agnelli, è stato possibile evidenziare, però, come sia la placenta stessa a fornire lattati al feto. Molti studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che la placenta di diverse specie animali ha una elevata attività di glicolisi aerobia, che porta poi alla produzione di modiche quantità di lattato. Il lattato prodotto dalla placenta rappresenta un importante substrato per il metabolismo fetale. Infatti, il lattato assunto dalla circolazione ombelicale viene catabolizzato in anidride carbonica ed acqua, richiedendo 1/4 del consumo totale di ossigeno fetale (Burd et al., 1975).

4 FISILOGIA DEL NEONATO

L'ambiente intrauterino garantisce non solo gli scambi gassosi, nutrizionali e escretivi attraverso la placenta, ma anche il mantenimento di una temperatura corporea costante ed una protezione meccanica del feto. Con il parto, il neonato deve, in tempi brevi, adeguarsi all'indipendenza neonatale. Qualsiasi anomalia nel processo del parto costituisce un fattore di rischio per la sopravvivenza nelle prime ore di vita.

4.1 Apparato respiratorio

I meccanismi di controllo della funzione respiratoria, pur sviluppandosi prima della nascita, richiedono un'ulteriore maturazione nel periodo post-natale. Il controllo nervoso della respirazione è immaturo, nonostante l'innervazione vagale colinergica delle vie aeree, presente ed efficiente fin dalla nascita, permetta il funzionamento sia del riflesso del tono broncomotore sia delle vie efferenti vagali. Al contrario è stata dimostrata l'immatunità dei chemiocettori carotidei e della parete toracica, oltre che una superficie alveolare pari a un terzo di quella dell'adulto.

Negli ultimi giorni di gestazione, la secrezione di cortisolo fetale stimola la produzione del surfactante polmonare da parte degli pneumociti di tipo II, costituito al 90% di fosfolipidi. Il surfactante riduce la tensione superficiale dell'interfaccia aria liquido che bagna le pareti alveolari, riducendo di conseguenza la pressione necessaria per mantenere la distensione alveolare. Il surfactante interviene anche nei meccanismi difensivi grazie alla stimolazione della fagocitosi macrofagica. E' stato dimostrato che il surfactante polmonare viene prodotto nei feti di sesso femminile e maschile rispettivamente non prima di 62 e 63 giorni dopo il picco di LH, evidenziando una differenza legata al sesso già riportata nei feti umani.

Con la rottura del cordone ombelicale si viene a creare una condizione di ipossia che associata all'aumento delle resistenze vascolari periferiche, comporta uno stato di dispnea, che induce la contrazione dei muscoli toracici, la creazione di una pressione negativa delle vie aeree, e il conseguente ingresso di aria nei polmoni. Tutto ciò induce un aumento del flusso ematico polmonare. La stimolazione del respiro alla nascita è indotta da diversi fattori: il passaggio del feto nel canale del parto, la pressione di CO₂ ematica, il distacco placentare e il riflesso cutaneo respiratorio evocabile a livello della regione ombelicale e genitale. La temporanea ipossia alla nascita comporta oltre a un ridotto apporto di ossigeno ai tessuti un accumulo di anidride carbonica, un prevalente metabolismo anaerobio con accumulo di radicali acidi non metabolizzabili per mancanza di ossigeno e un rapido esaurimento delle riserve glucidiche. Tutto ciò conduce ad uno stato di acidosi mista (metabolica e respiratori) e un potenziale stato di ipoglicemia.

4.2 Apparato cardio-circolatorio

Nel feto l'apparato cardio-circolatorio è caratterizzato dalla presenza di strutture di comunicazione provvisorie, quali il dotto arterioso e il forame ovale, che escludono i polmoni dal circolo spostando la sede degli scambi gassosi a livello placentare. Quindi la bassa concentrazione di ossigeno a livello polmonare causa vasocostrizione e aumento delle resistenze vascolari polmonari che persistono fino alla nascita. Al primo atto respiratorio, l'aumentata saturazione d'ossigeno provoca la vasodilatazione delle arteriole e il rilascio di prostaciline con effetto dilatante che inducono un aumento del flusso ematico. L'aumentata

pressione del comparto sinistro induce la chiusura funzionale prima e anatomica poi del forame ovale a sede interatriale, interrompendo così lo shunt ematico destro sinistro che caratterizza la circolazione fetale. L'aumentata saturazione di ossigeno in circolo e il rilascio di fattori inibitori delle prostaglandine, cui il dotto arterioso è molto sensibile, determinano una contrazione della componente muscolare della parete duttale entro 12-24 ore dal parto (chiusura funzionale). La chiusura anatomica del dotto arterioso avviene invece entro una settimana dalla nascita, pertanto nei primi giorni di vita è possibile riscontrare un soffio cardiaco. Il carico ematico maggiore nel settore cardiaco destro, in particolare nel ventricolo, durante la fase fetale comporta un aumento del ventricolo destro rispetto al sinistro. Dopo la nascita tale rapporto si inverte passando da valori da 1:1 a 1:2 o 1:3. La frequenza cardiaca del neonato è controllata dal sistema nervoso vegetativo che presenta caratteri di immaturità strutturali e funzionali. Nel neonato quindi l'integrità surrenalica è necessaria per assicurare un'appropriate risposta ventricolare alla stimolazione del simpatico. I barocettori intervengono nel controllo della pressione sanguigna dal quarto giorno di vita, dopo tale periodo è presente il tono vasomotore, così che gli stati di anossia danno origine a bradicardia e ipotensione, ma a differenza dell'adulto non comportano rischi di insufficienza circolatoria se non a valori particolarmente ridotti (<8 mmHg). Nel neonato i limiti pressorisono inferiori rispetto all'adulto (49/94 mmHg) anche a causa dell'immaturità muscolare della parete arteriosa, i valori pressoristici dell'adulto sono raggiunti non prima dei 9 mesi di età. Infine l'attività contrattile del miocardio non completamente sviluppata rende difficile al neonato compensare le gravi emorragie, l'ipertermia e squilibri acido-base. Il ritmo cardiaco del cucciolo è di tipo sinusale regolare, non associato ai pattern respiratori per l'assenza nelle prime 8 settimane di un'attività vagale a causa dell'immaturità della componente parasimpatica.

4.3 Apparato digerente

L'apparato gastro-enterico neonatale è immaturo sotto molti aspetti sia strutturali sia funzionali. Nel cane lo strato muscolare del piccolo intestino è più sottile del 50% rispetto a quello dell'adulto, mancano gli enzimi pancreatici e non è ben sviluppata l'alfa glicosidasi creando problemi alla digestione del saccarosio e del maltosio. L'assenza degli enzimi

pancreatici è controbilanciata da alcuni meccanismi fisiologici del neonato, l'assenza della lipasi è compensata dalla particolare permeabilità iniziale degli enterociti alle macromolecole, mentre la presenza della lipasi gastrica supplisce la carenza della lipasi pancreatica. Alla nascita il neonato è privo di denti, che compaiono sotto forma di dentizione decidua attorno alle 3-4 settimane. La formula dentaria decidua è così costituita 2 X (6 incisivi, 2 canini, 6 premolari)= 28. L'eruzione della dentizione permanente inizia a 4 mesi e si completa a 7 mesi: 20 denti nell'arcata superiore (6 incisivi, 2 canini, 8 premolari e 4 molari) e 22 denti dell'arcata inferiore (6 incisivi, 2 canini, 8 premolari, 6 molari). Con la nascita ha l'inizio dell'attività digestiva del latte con l'attivazione dei processi di secrezione enzimatica, motilità e assorbimento gastro enterico. A causa della limitata capacità di produrre acido cloridrico il pH gastrico dei neonati è meno acido rispetto all'adulto, riducendo la capacità difensive gastriche e favorendo la sopravvivenza batterica. La produzione di enzimi pancreatici è ridotta per consentire l'assorbimento intestinale delle immunoglobuline colostrali. La produzione delle lipasi pancreatiche aumenta nelle prime tre settimane di età, parallelamente all'incremento del tenore in grasso del latte materno, mentre l'amilasi è prodotta dal pancreas dopo le tre settimane di età pertanto in questo periodo la digestione dei carboidrati è sostenuta dall'amilasi contenuta nel latte materno. L'intestino del neonato può considerarsi completamente maturo solo dopo le prime tre settimane di vita. Fino a 40 giorni la motilità dell'intestino sembra dipendere più dal gradiente pressorio che dall'attività elettrica. Alla nascita la mucosa intestinale presenta un transitorio aumento della permeabilità che permette l'assorbimento delle macromolecole per pinocitosi indispensabile per l'assorbimento delle immunoglobuline colostrali, questa permeabilità è massima nelle prime 2-3 ore dopo la nascita, e termina a 24-48 ore dopo la nascita. L'assorbimento delle immunoglobuline colostrali comporta l'immediata perdita della permeabilità transitoria per evitare il fenomeno della traslocazione batterica. L'ingestione del colostro è anche utile per avviare i processi di eliminazione del meconio che risultano dalla deglutizione del liquido amniotico e dalle secrezioni dell'apparato gastro enterico. Nel corso della gestazione la placenta sostiene diverse funzioni che nell'adulto sono a carico del fegato. Alla nascita il fegato non è in grado di compiere la gluconeogenesi e la glicogenolisi. La secrezione di bile è inferiore rispetto all'adulto e la produzione di secretina e glucagone fino a tre giorni di età indicando una condizione di colestasi fisiologica e transitoria. Le caratteristiche stesse della

bile sono differenti con quantità maggiori di ioni cloro e bicarbonato e minore di acidi biliari e sodio. Nel neonato le elevate concentrazioni di alp e ggt sembrano attribuibili all'attività intestinale placentare e colostrale. La produzione epatica di albumine è bassa fino a 8 settimane di età, mentre le globuline inizialmente basse aumentano in risposta ad una stimolazione antigenica. La reazione di fase I, ossidazione, e II, glucuronidazione, sono limitate nel neonato con riduzione del metabolismo epatico nei confronti di alcuni farmaci. Il neonato non è in grado di provvedere all'omeostasi glicemica a causa dell'imaturità epatica nella funzione gluconeogenetica, delle scarse riserve epatiche di glicogeno, dell'insensibilità dell'insulina, delle ridotte masse muscolari, dello scarso tessuto adiposo, e della ristretta disponibilità di acidi grassi liberi. Per questi motivi i neonati sono ad alto rischio di ipoglicemia anche dopo brevi digiuni. Le ridotte riserve di glicogeno garantiscono una stabilità glicemica solo nelle prime tre ore dopo la nascita, riducendosi del 50% entro le prime 24 ore. L'ipoglicemia è tipica anche della sepsi, dell'endotossitemia e delle parassitosi.

4.4 Apparato genito-urinario

Nel corso della vita fetale, con lo sviluppo dell'apparato urinario, il rene inizia la sua attività escretiva che dalla vescica urinaria fetale passa attraverso l'uraco alla cavità allantoidea. Alla nascita la nefrogenesi è incompleta si completa a 3 settimane di età. La funzionalità renale è caratterizzata da un basso tasso di filtrazione glomerulare, ridotto flusso ematico renale, bassa frazione di filtrazione, diminuito riassorbimento di amminoacidi e fosfati, aumentata natiuresi tubulare e scarsa capacità di concentrazione delle urine. Nel neonato la perfusione renale è strettamente dipendente dalla pressione arteriosa e a differenza dell'adulto sembra non soggiocare al controllo dell'angiotensina fino a 6 settimane di età. La ridotta capacità di concentrazione delle urine potrebbe essere dovuta all'imaturità strutturale e funzionale dell'ansa di Henle, agli inadeguati meccanismi contro corrente, al diminuito riassorbimento di sodio, e alla ridotta concentrazione di urea. L'escrezione di acido urico, come quella delle proteine, diminuisce dalla nascita ai primi tre settimane di vita, costituendo quindi reperti di normale riscontro all'esame delle urine. La minzione dei neonati non è spontanea fino a 3 settimane di età, ma è mediata da un riflesso spinale somato-vescicale indotto dalla stimolazione perineale. Tra le 3 e le 5 settimane di età questo riflesso viene sostituito dal

riflesso vescico-vescicale sopraspinale evocato alla distensione della vescica e sottoposto al controllo volontario. Essendo la nefrogenesi disidratata, al sovraccarico di liquidi e a farmaci. L'esame delle urine del neonato mostra un PS di 1006-1017 fino a 8 settimane di età, normale il riscontro di glicosuria e proteinuria in alcuni casi di aminoaciduria fino a 3 settimane di età. Il riscontro di ematuria e emoglobinuria è sempre da considerarsi patologico.

4.5 Apparato muscolo-scheletrico

Alla nascita i neonati si muovono in modo strisciante a causa della loro immaturità neurologica e muscolo-scheletrica. Progressivamente si assiste alla crescita degli elementi cartilaginei e alla mineralizzazione ossea con rimodellamento influenzato dal contemporaneo sviluppo neurologico, che caratterizza una prima fase di ipertono flessorio (primi 4 gg) seguita da un'ipertono estensorio (da 4 a 21 giorni), culminante nella normotonia dalla terza-quarta settimana di vita. Da un'iniziale adattamento strisciante, si passa ad un'andatura saltellante e dalla terza settimana una vera e propria locomozione. Tutte le masse muscolari sono ridotte nel neonato, fatta eccezione per alcuni elementi quali lingua, labbra e muscoli orbicolari.

4.6 Sistema nervoso

Nel neonato è riconosciuta la minore sensibilità celebrale agli insulti ipossico ischemici. Alcuni studi hanno dimostrato che nei primi 6 giorni di vita si ha una sorta di disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa dalla respirazione con conseguente riduzione della sintesi di ATP. Il cervello del neonato sarebbe quindi in grado di fronteggiare la ridotta disponibilità energetica per un periodo di tempo più lungo. Questo probabilmente sarebbe da imputare alle caratteristiche delle membrane cellulari con una maggior capacità di mantenere l'equilibrio ionico da entrambe i lati delle membrane cellulari. Nella prima settimana di vita il cucciolo trascorre il 90% del suo tempo dormendo. Il sonno è caratterizzato da una certa attività motoria contraddistinta da trepidi, pedalamenti, occasionali vocalizzazioni. Tra la prima e la seconda settimana aumenta il tempo di veglia. La presenza della funzione vestibolare è indispensabile fin dalla nascita per l'assunzione della corretta posizione durante la poppata. Dai 10 giorni di vita i neonati iniziano a sostenersi inizialmente sugli arti posteriori, con

tremori che ne denotano la fatica. Tra i 16 e i 21 giorni inizia una deambulazione scoordinata che diviene coordinata progressivamente intorno ai 28 giorni di vita con lo sviluppo delle capacità esplorative.

La risoluzione dell'anchiloblefaron fisiologico , che non corrisponde all 'acquisizione della capacità visiva avviene tra i 10 e i 16 giorni, ed è dovuta al conseguimento del riflesso di lacrimazione e alla produzione di film lacrimale. Successivamente alla normale separazione delle palpebre la cornea può presentarsi opaca per le prime 24 ore a causa di un temporaneo edema corneale .La capacità visiva è limitata per le prime 3 settimane di età . I condotti uditivi esterni si aprono tra 2 e 14 giorni , segue una fase di desquamazione epiteliale . L'orientamento acustico si instaura tra 21 e 28 giorni di vita .L'olfatto sembra invece l'unico senso presente fin dalla nascita e consente il raggiungimento della mammella.

5 LA PLACENTA DEL CANE

La placenta è un organo temporaneo esistente solo durante la gravidanza e che deriva dall'apposizione di una componente materna, l'endometrio, con una fetale, il corion. Il ruolo principale della placenta è quello di assicurare l'apporto di nutrienti al feto, e di garantire l'escrezione dei cataboliti prima dello sviluppo del sistema emuntorio (Barone, 2003).

La placenta di tipo endotelio coriale e emocoriale (Carnivori, Roditori, Primati), consente anche il passaggio di immunoglobuline. Le immunoglobuline, insieme al colostro assunte al momento della nascita, permettono al neonato di acquisire l'immunità passiva necessaria nei primi giorni e settimane della vita extrauterina (Veggetti, 1982).

In una prima fase dello sviluppo, l'accrescimento dell'embrione è permesso grazie alle secrezioni delle ghiandole uterine che prendono il nome di "latte uterino" (Richter & Götze, 1994). Durante questa fase iniziano a svilupparsi gli invogli fetali e si differenziano i vari tessuti embrionali (Veggetti, 1982).

Solo con la presa di contatto del trofoblasto con l'endometrio materno e l'instaurarsi del labirinto placentare, si viene a sviluppare la placenta come vero e proprio organo di scambio tra la madre e i feti (Barone, 2003).

5.1 Classificazione

La placenta dei carnivori per la sua forma viene definita placenta zonata o cintura placentare . La cintura placentare è compresa tra due poli paraplacentari privi di villi coriali. Solo la cintura placentare possiede un'area di contatto disponibile per gli scambi fisiologici che aumenta grazie a delle interdigitazioni che si sviluppano per apposizione dei tessuti materni con quelli fetali (Amoroso, 1952; Malasinné A, 1975).

Nella placenta dei carnivori, il rapporto che si instaura tra il flusso sanguigno materno e quello fetale viene considerato di tipo incrociato (Faber et al. 1983; Leiser et al., 1984; Dantzer, 1988; Bjorkman, 1989; Leise et al., 1998).

Secondo una classificazione basata sugli strati tissutali interposti tra la madre e il feto, la placenta dei carnivori viene definita endoteliochoriale (Leiser et al., 1993), cioè l'endotelio dei vasi materni è direttamente a contatto con il trofoblasto. Tuttavia nelle porzioni paraplacentari periferiche esiste una barriera epiteliochoriale (Leiser et al., 1980).

5.2 Impianto

Per impianto si intende la presa di contatto del trofoblasto con l'endometrio che avviene dopo il dissolvimento della zona pellucida e la fissazione ad esso della blastocisti inizialmente mobile (Richter & Götze, 1994). L'impianto nella cagna avviene, in genere, tra il 14° e il 18° giorno dopo l'ovulazione (McGready et al., 2006). L'impianto si divide in tre fasi: l'apposizione, l'adesione e l'intrusione (Leiser et al., 1993).

5.2.1 Fase di apposizione

Durante la fase di apposizione l'embrione è trilaminare, cioè è costituito dal trofoblasto, dal mesoderma e dall'endoderma. Le cellule trofoblastiche sono mutate, ed hanno assunto un aspetto colonnare, avendo stabilito dei primi punti di contatto con l'epitelio materno. Il trofoblasto presenta una notevole attività di micropinocitosi, apparentemente stimolata dalla crescente attività secretoria delle ghiandole uterine (Leiser et al., 1993).

5.2.2 Fase di adesione

Durante questa fase il trofoblasto prende progressivamente un maggiore contatto con l'epitelio uterino. L'adesione è rafforzata dai processi intrusivi sia del trofoblasto che dell'epitelio uterino. In questa fase si realizza la disintegrazione dei processi giunzionali dell'endometrio materno, e il passaggio da un'attività di micropinocitosi del trofoblasto ad una più marcata di fagocitosi (Leiser, 1982).

5.2.3 Fase di intrusione

Nelle fasi iniziali del processo di intrusione, lo spazio rimanente tra il trofoblasto e l'epitelio uterino viene eliminato (Leiser et al., 1993).

Poco prima del contatto tra l'embrione e endometrio materno, il trofoblasto del terzo centrale del corion prolifera e forma due diversi tipi di tessuto.

Le cellule adiacenti al mesoderma del corion conservano aspetti epiteliali e sono complessivamente indicate come citotrofoblasto, mentre quelle poste al di sopra del disco embrionale proliferano rapidamente e formano, sopra il citotrofoblasto un sincizio, quello che viene denominato sinciziotrofoblasto.

Il sinciziotrofoblasto ha capacità altamente invasive e provoca distruzione dell'epitelio e del sottostante connettivo dell'endometrio (Noden & Lahunta, 1991), fino a raggiungere l'endotelio dei capillari materni stabilendo, così, la tipica barriera placentare dei carnivori, di tipo endoteliochoriale (Leiser et al., 1993).

La struttura lamellare placentare si sviluppa quando si vengono a formare dei processi digitiformi del corion che penetrano l'endometrio, creando così un'alternanza di lamelle di tessuto fetale e materno.

Le lamelle fetali o villi coriali, sono costituite da una porzione centrale mesenchimale, ricoperta superficialmente da un doppio strato di cellule trofoblastiche. Lo strato interno è

formato dal citotrofoblasto, mentre esternamente si rinviene il sinciziotrofoblasto (Leiser et al., 1993).

I villi, una volta formato il labirinto placentare, appaiono ampiamente ramificati e lobulari (McGready, 2006).

Nei carnivori, la vascolarizzazione dei villi coriali viene fornita sia dal sacco vitellino, e pertanto si parla di onfaloplacenta o placenta corio-vitellina, che dalla rete allantoidea, definita anche allantoplacenta o placenta corio-allantoidea (Barone, 2003).

I villi coriali si sviluppano dapprima su quasi tutta la superficie del corion, ad eccezione delle due estremità della struttura ovoide e di una piccola zona circolare in corrispondenza dell'aria embrionale .

A partire da questo momento, ovvero nella cagna tra il 16°÷17° giorno di sviluppo, l'accrescimento dell'embrione non avviene prevalentemente in lunghezza e non più in modo uniforme, in quanto le regioni polari che sono sprovviste di villi coriali, si allungano più velocemente delle altre parti.

Il *conceptus* acquisisce così la forma di un limone dalle estremità allungate, e presenta tre regioni: una fascia intermedia villosa, che forma la placenta (spessa circa 10 mm) (Leiser et al., 1993), e due regioni polari periferiche lisce, che delimitano la fascia intermedia. Queste due regioni polari inizialmente sono molto più piccole della fascia intermedia (lunghe circa 1,5 mm) (Leiser et al., 1993), ma nella seconda metà della gravidanza diventano uguali ad essa (Fig.) (Barone, 2003).

Nella cagna, così come negli altri carnivori, l'impianto viene definito centrale, l'endometrio è invaso dal trofoblasto soltanto in una fase relativamente tardiva dello sviluppo embrionale. La blastocisti rimane libera di accrescersi nella cavità uterina per un tempo abbastanza lungo (Barone, 2003).

L'impianto richiede un sinergismo dei meccanismi tra la madre e la blastocisti. Infatti gli alti livelli di estrogeni prodotti durante la fase follicolare del ciclo estrale, causano la proliferazione dell'endometrio, mentre il progesterone che viene prodotto durante la fase

luteinica, rende l'endometrio recettivo alla blastocisti.

La mucosa uterina in questa fase appare ampiamente ripiegata, e si assiste ad una marcata ipertrofia delle ghiandole uterine, sia superficiali che profonde. In tutti i mammiferi, il progesterone, prodotto dal corpo luteo, è essenziale sia per lo stabilimento che per il mantenimento della gravidanza. Il corpo luteo nella cagna rimane comunque presente e continua a produrre progesterone sia nelle femmine gravide che in quelle non gravide.

Ai fini del riconoscimento materno di gravidanza non è quindi importante che la blastocisti produca delle sostanze specifiche per segnalare la propria presenza alla madre (McGready, 2006).

5.3 Placentazione

A seguito dell'impianto ha inizio la placentazione, che è il processo che porta alla formazione della placenta. La placenta è un organo temporaneo di scambio materno-fetale, esito dall'unione del corion fetale con la mucosa uterina.

Dopo la placentazione, la nutrizione dell'embrione tramite il "latte uterino" viene integrata fino ad essere sostituita dalla nutrizione emotrofica fornita dalla circolazione materna (Noden & Lahunta, 1991).

5.4 Organo ematofago placentare

Quello che viene definito organo ematofago placentare, è in realtà un accumulo di sangue materno che si rinviene tra il corion e l'endometrio.

Definita anche ematoma marginale o bordo verde costituisce un'importante fonte di ferro per il feto.

Nonostante in letteratura sia stato fatto ampio uso del termine ematoma per descrivere questa

struttura, la definizione risulta inappropriata in quanto sarebbe molto più corretto parlare di un patologico accumulo di sangue stravasato (McGready, 2006). Il sinciziotrofoblasto invade l'endometrio intatto e penetra all'interno dei vasi materni, con un conseguente stravasato di sangue e formazione di "tasche" ematiche (Dantzer, 2003). Questa regione non ha però analogie con una placenta emocoriale, in quanto il sangue al suo interno non circola (Wynn et al., 1969).

L'area dell'organo ematofago placentare è formata da un epitelio endometriale colonnare e da trofoblasti ematofaghi (Leiser et al., 1993), i quali sono a diretto contatto con questo sangue stravasato, e possiedono dei microvilli che aumentano l'assorbimento dei globuli rossi e di altri nutrienti (McGready, 2006).

Vicino al margine placentare i trofoblasti diventano colonnari, e il loro citoplasma contiene vacuoli di pigmenti ematici fagocitati (Krebs et al., 1997).

Il drenaggio venoso materno di questa zona è minimo, e dall'epitelio del corion vengono prodotte delle sostanze che ne impediscono la coagulazione (Noden, 1991).

A causa della diversa natura dei prodotti che derivano dalla demolizione dell'emoglobina, la zona dell'organo ematofago placentare assume un tipico colore verdastro nella cagna (Noden, 1991).

Durante il parto il contenuto degli ematomi marginali si mescola ai lochi che vengono eliminati nel contesto delle perdite vulvari (Richter & Götze, 1994).

5.5 Morfologia placentare

Nei carnivori la placenta è zonata, ossia la superficie di scambio materno-fetale è circoscritta ad un'area equatoriale che circonda il feto, sviluppando quella che viene definita cintura placentare (Miglino et al., 2006).

Oltre alla placenta, il feto è circondato, durante la vita intrauterina, dagli invogli o membrane fetali (McGready, 2006).

Le membrane fetali delimitano i liquidi amniotici e quelli allantoidei, i quali durante la vita fetale contribuiscono alla protezione, idratazione, maturazione e sviluppo fetale (Barone, 2006).

Da un punto di vista morfologico, nella placenta si distinguono (Veggetti, 1986): il sacco vitellino, il sacco amniotico, il sacco allantoideo e il corion (Fig 5.1).

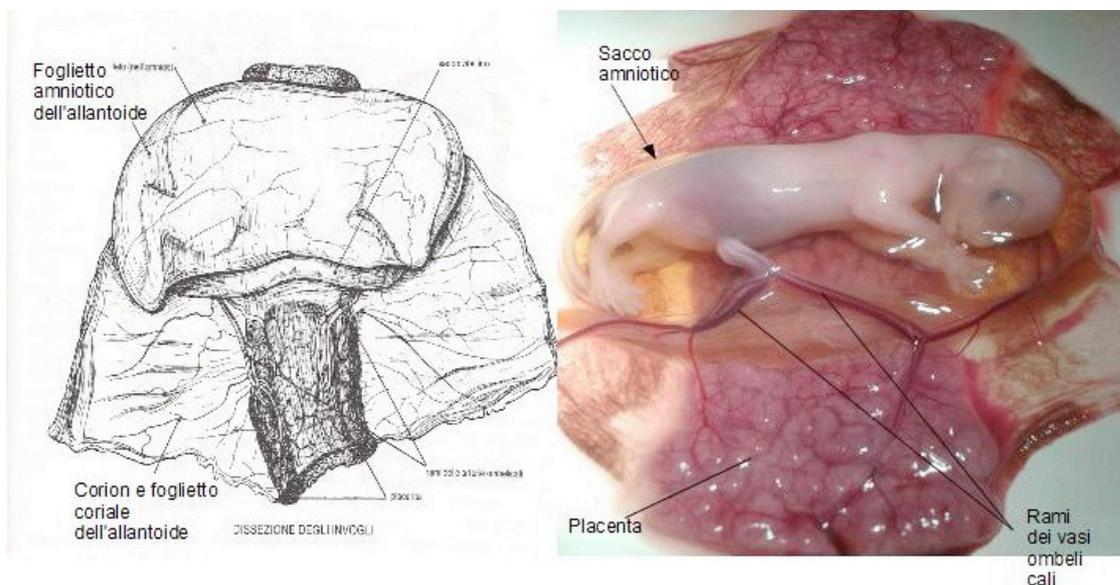


Fig. 5.1 A: Annessi fetali della cagna (modificato da Barone, 2003); B: feto nell'amnios, placenta e rami dei vasi ombelicali.

5.5.1 Sacco vitellino

Il sacco vitellino, o “vescicola ombelicale”, è un annesso embrionale transitorio, che ha il compito di assicurare grazie alla sua rete sanguinea (rete vitellina), i primi scambi tra l'embrione e l'ambiente uterino (Barone, 2003).

Deriva dall'endoblasto extraembrionale e pertanto è in continuità con l'endoderma dell'intestino, il sacco vitellino è inizialmente sferoidale e più grosso dell'embrione in formazione.

Poiché l'accrescimento dell'embrione è molto più rapida, il sacco vitellino assume ben presto l'aspetto di un'appendice, il cui peduncolo è inglobato nella formazione del cordone ombelicale. Esso si presenta come un sacco piriforme o discoidale, la cui parete delimita la cavità vitellina, contenente una piccola quantità di liquido.

Questa cavità si estende nel peduncolo vitellino fino all'intestino medio tramite il condotto vitellino o "vitello intestinale". Il peduncolo vitellino è accompagnato dalle arterie e dalle vene vitelline, che mettono in rapporto la rete sanguinea vitellina con l'apparato circolatorio dell'embrione (Barone, 2003).

La struttura istologica è molto simile a quella dell'allantoide, ma l'epitelio che ne tappezza la cavità è costituito da cellule più alte, cubiche o prismatiche .

Esso ha il compito di assicurare la nutrizione dell'embrione, fino alla costituzione dell'allantoide e della rete placentare (Barone, 2003).

I vasi sanguigni del sacco vitellino rappresentano i progenitori del sistema ematogeno extraembrionale e angiogenetico, in quanto contengono numerosi emangioblasti che sono responsabili dello sviluppo della vascolarizzazione embrionale (Miglino et al., 2006).

5.5.2 Sacco amniotico

Il sacco amniotico o amnios è il foglietto embrionale più interno, che avvolge completamente e intimamente il feto, il quale è immerso nel liquido amniotico (Barone, 2003).

La sua faccia esterna è aderente all'allantoide che lo avvolge e lo separa dal corion.

La faccia interna è libera, ha l'aspetto di un rivestimento sieroso e che produce il liquido amniotico; essa è provvista, soprattutto in prossimità del cordone ombelicale, di piccoli rilievi papillari, che gli conferiscono un tipico aspetto rugoso (Barone, 2003).

Nel sacco amniotico si evidenzia uno strato epiteliale e uno connettivale. Lo strato epiteliale è costituito da un epitelio semplice, a cellule piatte o cubiche.

Questo diventa stratificato sul cordone ombelicale, nel punto di transizione dell'epidermide cutanea del feto. Lo strato connettivale è esterno e molto sottile.

5.5.3 Sacco allantoideo

L'allantoide è un annesso fetale che costituisce la guida dei vasi ombelicali al momento del loro sviluppo e ne garantisce poi, il loro supporto (Barone, 2003).

Il sacco allantoideo si sviluppa molto precocemente dall'intestino caudale. Esso comunica con il seno uro-genitale dell'embrione per mezzo di un peduncolo cavo: il peduncolo allantoideo, che percorre il cordone ombelicale. Si dispone a mo' di sierosa, separando completamente l'amnios dal corion.

In esso si riconosce un foglietto cotiale, che è adeso al corion; un foglietto amniotico che riveste la superficie esterna dell'amnios;

Tra questi due foglietti, si estende la cavità allantoidea, ripiena del liquido omonimo ed attraversata solo dalla parte extramniotica del cordone ombelicale (Barone, 2003).

L'allantoide si delimita in una parte intraembrionale, in continuità con la parte ventro anteriore dell'ultimo tratto dell'intestino posteriore, ed in una extraembrionale che aumenta di volume, espandendosi nel celoma.

Le due parti sono collegate dal peduncolo allantoideo o uraco che scorre nel cordone ombelicale, posteriormente al peduncolo vitellino (Veggetti, 1982).

La parete allantoidea è sottile, presenta uno strato interno di tipo endoteliale, rivestito da una lamina mesoblastica esterna.

Lo strato endoteliale interno è formato da un solo strato di cellule piatte, poligonali. La lamina mesoblastica esterna è formata da un sottile strato di connettivo fibrillare .

La cavità allantoidea contiene un liquido giallo chiaro che traspare dall'allantocorion (Miglino

et al., 2006). L'organo placentare d'impianto e di scambio si forma solo in una zona dell'allantoide a cintura larga 2,5÷6 cm, situata nella parte mediana del sacco allantocoriale ellittico.

L'allantocorion, aumenta il proprio spessore in corrispondenza di questa cintura, sviluppa villi che invadono la mucosa uterina erodendo i tessuti materni e spingendosi in profondità nel connettivo, fino ad interessare le pareti vasali con l'esclusione del solo strato endoteliale (Richter & Götze, 1994).

5.5.4 Corion

Il corion è un sacco membranoso che costituisce l'invoglio più esterno del *conceptus*. Contiene l'embrione e tutti gli annessi, e la sua faccia esterna è strettamente adesa alla mucosa uterina e costituisce con questa la placenta, è quindi l'organo deputato alla fissazione del *conceptus* nonché provvede inizialmente alla sua nutrizione. Le membrane coriali di feti adiacenti in alcuni casi possono venire intimamente a contatto e persino fondersi (Barone, 2003).

La faccia esterna è inizialmente interamente ricoperta dai villi coriali, che nelle parti periferiche regrediscono, formando quello che viene definito corion liscio o *chorion laeve*, mentre, nella zona equatoriale del *conceptus*, questi rimangono distinti, formando il corion villosa o *chorion frondosum*. È proprio il corion frondoso che, venendo in rapporto con la mucosa uterina, forma la placenta (Veggetti, 1982).

La struttura del corion risulta dall'unione di due parti di origine diversa: trofoblasto all'esterno, e mesoblasto extraembrionale all'interno. Nelle parti di corion che non partecipano alla formazione della placenta, il rivestimento trofoblastico è caratterizzato da un epitelio generalmente prismatico semplice (Barone, 2003).

Nella porzione del corion frondoso, invece, le cellule del trofoblasto proliferano, si fondono e creano un sinciziotrofoblasto. All'interno del sinciziotrofoblasto penetra il mesoderma coriale vascolarizzato dai vasi allantoidei. Quest'ultimi si sollevano in lamelle che si anastomizzano

tra loro costituendo nel loro insieme il “labirinto placentare” (Veggetti, 1982).

5.5.5 Cordone ombelicale

Il cordone ombelicale (o funicolo ombelicale) deriva dal peduncolo ventrale dell'embrione, e fornisce il passaggio ai vasi che assicurano gli scambi vitali del feto. (Barone, 2003)

E' costituito da due parti, una amniotica, che collega l'ombelico del feto all'amnios, di cui attraversa la cavità, ed una parte extramniotica.

La parte amniotica, un funicolo biancastro, liscio e spesso, costituisce la quasi totalità del cordone ed è la parte più lunga.

La parte extramniotica è generalmente breve, e l'allantoide e lo riveste superficialmente. Il cordone ha una lunghezza che non supera più di 10 cm nella cagna (Barone, 2003).

L'organizzazione del cordone ombelicale è caratterizzata da un tessuto connettivo all'interno del quale decorrono il peduncolo vitellino e quello allantoideo e, soprattutto, i vasi ombelicali. Il tessuto mucoso del cordone viene definito “Gelatina di Wharton”. Il rivestimento è costituito da un epitelio cubico stratificato. Il rivestimento epiteliale è in continuità con la pelle attorno all'ombelico, e dall'altra parte con lo strato epiteliale dell'amnios, di cui ha la stessa derivazione.

Secondo molti autori le cellule stromali della “gelatina di Wharton” sono in grado, in base alla loro localizzazione all'interno del cordone, di differenziarsi in cellule mesenchimali o miotrofoblastiche (Benirschke, 2006a).

Le cellule più immature ed indifferenziate sono quelle che si trovano vicino alla superficie amniotica e, se coltivate *in vitro*, possono differenziarsi in cellule neuronali e gliali (Mitchell et al., 2003). Più in profondità, le cellule acquisiscono il citoscheletro e le caratteristiche di cellule contrattili.

In prossimità dei vasi ombelicali, sono stati osservati miofibroblasti altamente differenziati

che in più, esprimono la miosina del muscolo liscio (Benirschke, 2006a).

Le arterie e le vene ombelicali sono di tipo muscolare, all'interno della loro tonaca media vi sono molte cellule muscolari lisce. In particolare, in vicinanza dell'ombelico, esiste un ispessimento più o meno sfinteriale, che determina la loro occlusione al momento della rottura del cordone ed impedisce così che si sviluppi l'emorragia (Barone, 2003).

I vasi ombelicali sono:

- 1) due arterie ombelicali provenienti dalle arterie pelviche del feto, che servono ad eliminare i cataboliti e la CO₂ dal circolo fetale;
- 2) due vene ombelicali, che confluendo dalla rete vasale dell'allantocorion, fanno affluire sangue ossigenato e sostanze nutritive;
- 3) l'uraco, che dalla vescica urinaria del feto si dirige verso il sacco allantoideo (Richter & Götze, 1994).

5.5.6 Liquidi placentari

Sono liquidi che si accumulano durante la vita fetale all'interno dei sacchi fetali. Sono due: il liquido allantoideo, contenuto nel sacco allantoideo, e il liquido amniotico, contenuto nell'omonimo sacco (Veggetti, 1982). Svolgono svariate funzioni: protezione fetale (Veggetti, 1982); agevolano i movimenti fetali (Underwood et al. 2005); idratazione fetale (Veggetti, 1982); agevolano il passaggio del feto nel canale del parto al momento della sua espulsione alla nascita (Veggetti, 1982); maturazione e sviluppo degli apparati fetali (Underwood et al. 2005); accumulano urina e altre sostanze derivanti dal catabolismo fetale (Dyce, 2010). Il volume e la composizione dei liquidi fetali variano a seconda dell'età gestazionale (Aralla et al., 2012).

5.6 ISTOLOGIA PLACENTARE

La placenta endoteliocoriale dei carnivori si viene a formare quando il corion, cvascolarizzato dai vasi allantoidei, stabilisce un'intimo contatto con la mucosa uterina la quale viene erosa dall'attività delle cellule trofoblastiche. Nella placenta endoteliocoriale, la barriera materno-fetale si compone di tre strati cellulari e di due strati di tessuto connettivo. In particolare, gli strati che si riconoscono dalla parte fetale sono: l'endotelio dei vasi fetali, il mesenchima e il trofoblasto. Dal lato materno sono, invece, presenti uno strato interstiziale e l'endotelio dei vasi materni.

L'area di contatto materno-fetale aumenta grazie allo sviluppo di lamelle che hanno la funzione ampliare l'area per gli scambi di ossigeno, di CO₂, di nutrienti, e di prodotti metabolici. Tale aumento della superficie di contatto è resa possibile dalla conformazione del corion frondoso, e dalle modificazioni speculari che si realizzano all'interno della mucosa uterina (Barone, 2003).

La placenta zonata si compone di tre differenti aree, che possono essere evidenziate eseguendo una sezione istologica longitudinale :

1-una zona lamellare o labirintica, nella parte fetale della placenta;

2-una zona giunzionale, in connessione con lo strato uterino ghiandolare, localizzata al di sotto della zona labirintica (Dantzer, 2003);

3-a zona delle ghiandole endometriali, definita anche zona delle camere ghiandolari, zona spugnosa o *glandular chambers* (Aralla et al., 2013).

5.6.1 Labirinto placentare

Il labirinto placentare è quella porzione della placenta che si sviluppa dall'intreccio delle digitazione delle lamine materne con quelle fetali. Queste lamelle appaiono ramificate e disposte in maniera irregolare (Wynn et al., 1969). Le lamine fetali contengono: i capillari, una minima quantità di tessuto connettivo, uno strato di cellule citotrofoblastiche discontinue

e uno strato continuo di sinciziotrofoblasto (Anderson, 1969; Wynn et al., 1969; Malasinné, 1975). I trofoblasti sono separati dai capillari materni da una membrana interstiziale piuttosto irregolare ma abbastanza spessa (quella che Malassiné chiamò nel 1974 “*la substance inerte interstitielle*”). Le lamine materne, invece, si compongono di capillari che presentano uno strato endoteliale molto ispessito (Flood, 1993).

5.6.2 La zona di giunzione

La zona giunzionale si trova al di sotto della zona labirintica . Si compone delle porzioni terminali delle lamelle fetali, dei vasi materni e dei detriti cellulari. In quest'area, le cellule trofoblastiche fagocitano l'istotropo (Dantzer, 2003).

5.6.3 Le glandular chambers o zona spugnosa

E' costituita dalle ghiandole endometriali superficiali .Queste ghiandole formano uno strato, che si estende attorno alla cintura placentare, tra il labirinto placentare e lo strato del miometrio materno . Il muco prodotto da queste ghiandole pare avere effetto immunoprotettivo, ma anche la funzione di modulare l'accrescimento e l'invasione del trofoblasto all'interno della mucosa uterina (Grether et al., 1998). Si ipotizza che l'effetto protettivo del muco ghiandolare potrebbe essere dovuto anche all'alto contenuto di acido sialico (Grether et al., 1998). El Etreby (1975) dimostrò, utilizzando anticorpi anti-hCG, la presenza di sostanze hCG-simili all'interno delle cellule ghiandolari e del muco prodotto dalle *glandular chambers*. L'hCG (human chorionic gonadotropin) o gonadotropina corionica, è un ormone prodotto dall'embrione dopo il suo impianto nell'utero, ed è fondamentale durante la fase di placentazione e nel mantenimento della gravidanza, sia nell'uomo che nel cavallo. L'hCG svolge un importante ruolo immunoprotettivo e immunomodulatore. Come glicoproteina è inoltre molto ricca di mannosio (Heap et al., 1984). Nelle cagne che vengono trattate con sostanze abortigene, si è osservato un aumento del secreto delle ghiandole uterine e degli enzimi secreti dall'epitelio ghiandolare che contribuiscono sinergicamente a svolgere

un'azione distruttiva (Steiger et al. 2006).

5.7 MODIFICAZIONI DELL'ASPETTO ISTOLOGICO PLACENTARE DURANTE LA GRAVIDANZA

Durante la gravidanza si realizzano degli importanti cambiamenti nella forma e costituzione della placenta e dei tessuti extraembrionali. Le modificazioni coinvolgono anche l'endometrio materno a causa delle caratteristiche della placenta endoteliocoriale. La placenta dei carnivori viene considerata deciduata in quanto una parte della mucosa si distacca dall'utero al momento del parto insieme con gli invogli fetali (Dantzer, 2003). Sulla base delle modificazioni dei tessuti extraembrionali e della placenta, il periodo di gestazione nella cagna può essere divisa in tre periodi:

1-il primo periodo di gravidanza comprende il periodo di pre- e peri-impianto, che corrisponde alla fase di apposizione dell'embrione e all'inizio dell'invasione del trofoblasto all'interno dell'endometrio;

2-il secondo periodo è comprende l'accrescimento delle strutture extraembrionali , la costituzione della placenta fino alla formazione del labirinto placentare. Alla fine di questo periodo viene raggiunta la massima complessità morfologica della placenta;

3-il terzo periodo è caratterizzato dal perfezionamento e dallo sviluppo sia della placenta che dei tessuti extraembrionali (Aralla et al., 2013).

5.7.1 Primo periodo: pre- e peri- impianto

In questo periodo la blastocisti è libera di fluttuare all'interno del lume uterino ed è separata dalla mucosa materna dalla zona pellucida. La blastocisti libera è composta, semplicemente, dal nodo embrionale e dal trofoblasto (Aralla et al., 2013). Durante la fase iniziale della gravidanza, l'epitelio endometriale materno è caratterizzato da cellule vacuolari colonnari alte (come nel diestro). Successivamente, l'endometrio si rivestirà di un epitelio, che gli conferisce

un aspetto schiumoso, di tipo isoprismatico, composto da cellule con formazioni citoplasmatiche vacuolari (Aralla et al., 2013). In questa fase iniziale, si può evidenziare una dilatazione delle ghiandole uterine superficiali che aumenta lo spessore dello stroma superficiale. In una fase successiva (intorno al 12÷14° giorno), l'epitelio endometriale mostra un sottile strato cellulare. Le porzioni superficiali delle ghiandole uterine si allungano e si ramificano, formando delle strutture tubulari che successivamente daranno origine alle camere ghiandolari. Con l'instaurarsi della gravidanza, le ghiandole uterine si portano in profondità all'interno dello stroma endometriale (Aralla et al., 2013). Le terminazioni ghiandolari si spostano sempre più vicino al miometrio materno, dove poi, si dilatano (Heap, 1984). Il trofoblasto è costituito da cellule schiumose, dotate di protrusioni, che si affacciano sull'endometrio materno a partire dal 12° giorno di gravidanza. In alcune aree dove poi si formerà il labirinto placentare, l'epitelio allantoideo e il corion, sviluppano i villi primari che penetrano nell'endometrio (Aralla et al. 2013).

5.7.2 Secondo periodo: formazione, sviluppo e accrescimento del labirinto placentare

Nella cagna, il labirinto placentare inizia a svilupparsi a partire dalla prima metà di gravidanza. Il citotrofoblasto ha già contribuito alla formazione del sinciziotrofoblasto. In questa fase, dal corion, il connettivo invade il labirinto placentare formando l'asse dei villi coriali. Al di sotto del labirinto si evidenziano delle strutture lacunari che creano la spongy zone (Aralla et al., 2013). La tipica morfologia lamellare della placenta canina risulta evidenziabile intorno al 18° giorno di gestazione. I villi coriali che per primi si accrescono vengono definiti villi primari e sono già evidenti intorno al 14° giorno. Essi sono formati da assi connettivali, che origina dal corion, e risulta rivestito esternamente da cellule trofoblastiche fuse in un sincizio (sinciziotrofoblasto), ed internamente da cellule trofoblastiche individuali (citotrofoblasti). Intorno al 38-45° giorno, con l'invasione dei vasi allantoidei all'interno del labirinto placentare, inizia l'accrescimento dei villi secondari (Aralla et al., 2013). Le camere ghiandolari presentano un lume dilatato, ricoperto da cellule colonnari e cubiche. Presentano attività secretoria e sono morfologicamente caratterizzate da protrusioni apicali simili a bolle (Aralla et al., 2013).

5.7.3 Terzo periodo

Dopo che il labirinto placentare ha completato la sua organizzazione morfologica continua ad accrescersi grazie allo sviluppo dell'abbondante tessuto connettivo che sostiene i villi coriali. I villi secondari contengono i vasi allantoidei fetali, a loro volta delimitati esternamente da uno strato interno di cellule citotrofoblastiche e ricoperti internamente da uno strato di cellule sinciziotrofoblastiche che circondano i vasi materni (Aralla et al., 2013).

5.7.4 Meccanismi che regolano l'invasione trofoblastica e lo sviluppo placentare

Il meccanismo di invasione delle cellule trofoblastiche all'interno dell'endometrio materno, e quello che permette il rilascio della placenta e degli involucri fetali al momento del parto sono fattori molecolari in cui risultano incluse le metalloproteine (MMPs) e i loro inibitori tissutali (TIMPs), il vascular endothelial growth factor (VEGF) e i suoi recettori (VEGFR), ed infine la kisspeptina e i suoi recettori cellulari. Le MMPs e i TIMPs regolano l'invasione e la migrazione del trofoblasto, così come la kisspeptina (KiSS-1) e il suo recettore. Il VEGF svolge, invece, un ruolo fondamentale nell'iniziare l'azione invasiva del trofoblasto (Fellows et al., 2012). Gli studi condotti fino ad ora su questi fattori riguardano soprattutto l'uomo, e in medicina veterinaria le specie da reddito qua il bovino. Gli animali da reddito sono serviti come modello per indagare patologie importanti nell'uomo, come la mancata involuzione dei siti placentari (SIPs), la ritenzione placentare e i processi infettivi che possono conseguire. Ancora pochi sono gli studi condotti sulla specie canina.

5.8 Vascolarizzazione placentare

Il labirinto placentare è formato nel cane da diverse unità rettangolari definiti lobuli (Amoroso, 1952). Al centro di ogni lobulo si trova l'arteria materna. Le arterie materne originano dai vasi che circondano le ghiandole endometriali (Pfarrer et al., 1999). Queste arterie insieme con i loro vasi tributari, esistono come vasi dell'endometrio, ancor prima

dell'impianto dell'embrione. I vasi materni emergono ad intervalli regolari dall'endometrio e attraversano il labirinto placentare in parallelo con i vasi fetali. Le singole unità lobulari sono unite da ponti vascolari che si anastomizzano tra di loro (Krebs et al., 1997). Il lobulo è delimitato alla periferia da 4÷5 vasi , che originano dalle arterie e vene fetali e che decorrono associate al centro dell'asse del villo coriale primario. I vasi fetali dispongono in forma esagonale attorno al lobulo. Dal villo coriale primario, originano i villi secondari con il loro complesso capillare dei villi terminali (Krebs et al., 1997).

5.8.1 Vascolarizzazione materna

La vascolarizzazione materna ha origine dai vasi che circondano le ghiandole endometriali. Le cripte si formano dalla progressiva dilatazione delle strutture vascolari attraverso la continua crescita dei villi fetali coriali che proiettano le loro digitazioni all'interno degli orifizi ghiandolari. Le cripte, a seguito di questo processo, assumono un diametro molto ampio. Nelle prime fasi della gravidanza anche il diametro dei capillari materni aumenta significativamente. Si assiste ad un aumento della densità del letto capillare, del diametro del lume vascolare e dell'attività di ramificazione dei vasi (Pfarrer et al., 1999). Con il procedere della gravidanza, le cripte vascolari continuano ad incrementare il loro diametro (dai 137,3 µm ai 217,8 µm) grazie al continuo accrescimento dei villi fetali. Il diametro dei capillari continua ad aumentare, mentre i capillari endometriali perighiandolari sono totalmente convertiti in sinusoidi (Pfarrer et al., 1999). Una conseguenza funzionale della dilatazione dei vasi in sinusoidi è il rallentamento del flusso di sangue. Questo rallentamento consente di garantire un maggior tempo di scambio placentare (Leiser et al., 1997).

5.8.2 Vascolarizzazione fetale

I vasi fetali, sia arterie che vene, originano dai vasi corionallantoidei. Sono vasi di piccolissime dimensioni. Sia nell'arteria che nella vena fetale, il tessuto elastico è assente. Il rivestimento muscolare dei vasi fetali è assottigliato e le cellule muscolari sono molto

disperse (Benirschke, 2006c). Dall'arteria e dalla vena fetale originano dei vasi arteriosi e venosi che decorrono assieme all'interno del villo primario, fino a raggiungere il versante opposto materno della placenta. Questa coppia di vasi è circondata da tessuto connettivo lasso (Krebs et al., 1997). Le arteriole e le venule sono caratterizzate, invece, da un endotelio con cellule colonnari (Benirschke, 2006c). Le cellule endoteliali dei capillari e dei sinusoidi sono organizzati in un monostrato cellulare e solo nella fase finale della gravidanza poggiano su una membrana basale. Queste cellule sono connesse le une alle altre da giunzioni intercellulari (Benirschke, 2006c). Molte di queste giunzioni intercellulari sono, da un punto di vista strutturale, delle tight junctions (Heinrich et al., 1988; Firth et al., 1996) che modulano il passaggio paracellulare di molecole con un peso molecolare inferiore ai 40.000 daltons (diametro molecolare di 6 nm). Per questo motivo il trasporto delle immunoglobuline γ (che hanno un peso molecolare di 150 kDa) avviene attraverso le vescicole plasmatiche (Leach et al., 1989) e la carica delle molecole influenza la loro permeabilità. Più precisamente il passaggio delle molecole cariche positivamente (i cationi) avviene sulla base delle dimensioni molecolari mentre, mentre per quelle cariche negativamente (gli anioni), il passaggio non avviene nemmeno se di piccole dimensioni (Firth et al., 1988).

6 LESIONI VASCOLARI NELLA PLACENTA

6.1 Vasculopatie trombotiche fetali

6.1.1 Trombosi

La trombosi è la formazione di trombi, cioè di coaguli che in condizioni patologiche originano dall'endotelio all'interno dei vasi sanguigni, che causa una progressiva ostruzione, totale o parziale, del lume vasale. Il trombo ha la stessa struttura del coagulo che, al contrario, si forma al di fuori del vaso sanguigno in caso di emorragia (Mancuso & Serri, 1984). Purtroppo non esistono studi a riguardo condotti nei carnivori. Tutta la letteratura disponibile riguardante vasculopatie placentari si riferisce all'uomo e alla sua placenta emocoriale. I trombi possono essere di due differenti tipi: trombi murali (i più frequenti) e trombi occlusivi.

I trombi murali (cioè quelli che si formano addossati alla parete vasale) e quelli occlusivi (cioè che occludono per interno il lume vasale) si sviluppano più spesso sui vasi superficiali della placenta e nelle loro ramificazioni e sono variabilmente distribuiti lungo la superficie placentare. Il trombo murale può evolvere in trombo occludente, in questo caso, il vaso appare come una struttura rotondeggiante fibromuscolare e priva di lume. I trombi coinvolgono soprattutto la circolazione venosa in quanto la parete venosa è più facilmente comprimibile rispetto a quella dell'arteria. I trombi superficiali possono essere visibili macroscopicamente tramite l'osservazione della superficie allantocoriale della placenta dal lato fetale dove, i vasi decorrono e si sviluppano. In presenza dei trombi i vasi appaiono, generalmente, allargati e di colore, perdendo il loro caratteristico colore lucente bluastro. (Beargen, 2005a). Nella placenta le lesioni degenerative non progrediscono come negli altri tessuti, non si assiste alla formazione di tessuto di granulazione o tessuto fibroso né la rimozione di detriti cellulari da parte di macrofagi. Queste lesioni placentari, al contrario, subiscono una retrazione, possono apparire alcuni fagociti, ma alla fine, il vaso calcifica e si atrofizza finoua completa scomparsa. Se il trombo è da tempo occludente o se il trombo si realizza all'interno di un'arteria, il villo che contiene il vaso trombizzato e si sviluppano i così detti villi avascolari. Nell'uomo, i villi avascolari differiscono da un vero e proprio infarto per il fatto che il trofoblasto è ancora perfuso dal sangue materno, in questa lesione avere un deposito si emosiderina. Nelle lesioni inveterate, i vasi staminali distali possono mostrare ispessimento della parete vascolare, con conseguente obliterazione del vaso (Beargen, 2005a). La base patogenetica che porta alla formazione lesioni trombotiche nella circolazione venosa placentare comprende molteplici cause, tra cui l'eccessiva lunghezza dei codoni ombelicali o una sua spiralizzazione, processi infiammatori della placenta e degli involgi fetali. Qualsiasi ostacolo alla circolazione fetale esita in congestione, che a causa della stasi venosa e dell'aumento della pressione intraluminare si traduce un danno endoteliale e nella successiva formazione di un trombo. La trombosi che si realizza nella circolazione arteriosa è in genere associata a stati coagulativi anormali della madre e del feto (Beargen, 2005a).

6.1.2 Depositi intimali di fibrina

Il deposito intinale di fibrina a livello placentare è un deposito di fibrina nell'intima del vaso e che sporge nel lume di questo, di solito non ne causa un'ostruzione significativa ma può generare ipertensione venosa (Beargen 2005a), è infatti una lesione molto molto simile a quella che si può evidenziare nei vasi polmonari di pazienti affetti da ipertensione polmonare. A volte, è possibile evidenziare un accumulo di mucopolissaccaridi e di sostanza fondamentale amorfa nell'intima vascolare che può evolvere in depositi calcifici nelle lesioni più avanzate (Beargen, 2005a).

6.1.3 Sclerosi fibro muscolare

La sclerosi è un processo patologico caratterizzato dalla proliferazione del tessuto connettivo di sostegno di un organo con conseguente atrofia del corrispondente parenchima (Mancuso & Serri, 1984). Questa lesione colpisce di solito i vasi di piccole dimensioni. Nella sclerosi fibromuscolare vi è un aumento della muscolatura liscia e del tessuto fibroso delle arterie che porta ad un restringimento lume vasale. Solo occasionalmente si può evidenziare un'occlusione completa del lume del vaso (Beargen, 2005a).

6.1.4 Endovasculite emorragica

L'endovasculite è un processo morboso caratterizzato dall'infiammazione della tonaca intima della parete vasale. L'endovasculite emorragica o HEV è, infatti, una microangiopatia che eziologicamente e patologicamente assomiglia alla glomerulopatia della sindrome emolitica uremica, può dar luogo a due tipi di lesione: la lesione subacuta o blanda e la lesione attiva o acuta o vilite emorragica. La lesione subacuta o blanda è caratterizzata da stravasamento di globuli rossi nello stroma e carioretti dei nuclei delle cellule endoteliali. L'integrità della parete del vaso viene persa. Nella lesione attiva abbiamo l'evidenza di infiltrati infiammatori nei villi con necrosi e distruzione della parete vascolare. Nell'uomo è stato anche possibile evidenziare

un tasso di recidiva del 28% nelle gravidanze successive (Beargen, 2005a)

6.2 Vasculopatie trombotiche non fetali

6.2.1 Coriangioma

Il corioangioma è in realtà una malformazione congenita dovuta ad una mescolanza di elementi costitutivi normali del tessuto, definito anche amartoma, piuttosto che una vera e propria neoplasia.

Macroscopicamente, il corioangioma è ben delimitato dal parenchima circostante e si ritrova spesso sulla superficie fetale della placenta. Se non vi è associata idrope fetale, l'intera superficie placentare può essere aumentata di volume ed edematosa (Beargen, 2005b). Da un punto di vista microscopico, il corioangioma è composto da una proliferazione di vasi sanguinei fetali, con scarso tessuto connettivo che li supporta. La componente stromale è molto abbondante, e la lesione può assomigliare ad un fibroma (Beargen, 2005b). Sono stati, inoltre, evidenziate anche fibre collagene e macrofagi. Il trofoblasto è iperplastico, questa alterazione è molto probabilmente determinata dalla localizzazione elevata di fattori di crescita angiogenetici, quali il fattore di crescita derivato dalle piastrine o PDGF-BB (Platelet-Derived Growth Factor), che promuove la proliferazione del trofoblasto (Ogino et al., 2000). Il corioangioma presenta una elevata cellularità, atipie delle cellule e intensa attività mitotica. Nonostante questi caratteri, il tumore ha sempre un andamento benigno; non sono mai state descritte metastasi e vere e proprie invasioni neoplastiche (Beargen, 2005b). A questa lesione è però associato un aumento della mortalità, ritardo di crescita fetale, anemia, cardiomegalia, insufficienza cardiaca, coagulazione intravasale disseminata (CID), emorragie placentari, parto prematuro e distacco placentare. In genere il neonato presenta trombocitopenia, dovuta al sequestro piastrinico nella massa tumorale (Beargen, 2005b).

6.2.2 Coriangiosi

Si parla di corangiosi quando il numero di capillari dei villi terminali contati risulta superiore

a dieci dieci in ognuno dei 10 villi in 10 campi microscopici in aree non infartuate della placenta. La proliferazione capillare avviene in risposta ad uno stimolo ipossico. Infatti, l'alterato rapporto villo/capillare è caratteristico di placenti ipossiche. Nella donna, questo tipo di lesione si rinviene nelle pazienti che vivono ad alte quote, in donne anemiche o che soffrono di pre-eclampsia. La presenza di corangiosi può essere valutata come indicatore di ipossia prenatale cronica. La sua presenza indica un ambiente intrauterino non ottimale per il feto e un tentativo, da parte della placenta, di ingrandire la superficie disponibile per la diffusione (Beargen, 2005c). Inoltre una possibile ulteriore causa che è stata annoverata nella patogenesi della coriangiosi, oltre all'ipossia cronica, è l'aumento della pressione intramurale, forse correlata a ostruzione venosa del cordone ombelicale o alterazioni a livello cardiaco fetale (Ogino et al., 2000). Altra possibile causa è l'aumento locale dei macrofagi e delle citochine, di derivazione macrofagica, che sembrano svolgere un importante ruolo nella formazione della coriangiosi (Kadyrov et al., 1998).

6.2.3 Coriangoematosi

Analogamente alla corangiosi, anche nella corangiomasiosi si realizza un aumento del numero di capillari nei villi, i villi che sono coinvolti sono solo quelli intermedi immaturi (Beargen, 2005c). Da un punto di vista istologico, la corangiomasiosi può essere divisa in : corangiomasiosi localizzata (focale o segmentale) e la multifocale diffusa. La corangiomasiosi localizzata coinvolge aree fetali di villi contigui. Nella forma segmentale si ha il coinvolgimento di più di cinque villi contigui, mentre nella forma focale, ne sono coinvolti meno di cinque (Beargen, 2005c). La corangiomasiosi multifocale diffusa coinvolge più settori della placenta. Nell'uomo, la forma di corangiomasiosi localizzata è associata a prematurità, preeclampsia e gravidanze gemellari. La corangiomasiosi multifocale diffusa è invece associata a ritardo di crescita intrauterino, anomalie congenite e megalie placentari (Beargen, 2005c).

Nel primo periodo della gravidanza, i capillari si vengono a formare per vasculogenesi. Le cellule mesenchimali, sotto l'influenza dei trofoblasti, si differenziano nelle corde angioblastiche. Nelle fasi successive, la vascolarizzazione si sviluppa per angiogenesi, cioè i

vasi già presenti si ramificano e si sviluppano ulteriormente dai vasi preesistenti (Demir et al., 1989; Asan et al., 1999). Entrambi questi processi dipendono dal fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) che viene rilasciato sia dalle cellule mesenchimali sia da quelle trofoblastiche sotto l'influenza di stimoli esterni quali l'ipossia, l'ipoglicemia e l'ipoferrémia (Dor et al., 1997). La successiva crescita e sviluppo placentare dipendono dai fattori di crescita derivati dalle piastriche, che permettono la differenziazione dei periciti, i quali a loro volta, producono angioproteine che controllano il rimodellamento del plesso vascolare primario in un capillare maturo. (Beck et al., 1997). Alla fine, l'interazione tra le cellule endoteliali e i periciti porta all'attivazione del fattore di crescita trasformante β o TGF- β , che impedisce un'ulteriore crescita dei vasi e promuove la differenziazione terminale in capillare maturo (Lindahl et al., 1997).

PARTE SPERIMENTALE

7 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo studio è stato applicare, per la prima volta nella specie canina, delle tecniche di analisi d'immagine (ImagJ) per andare a valutare le caratteristiche istologiche placentari ,normali e patologici, ed in particolare la microvascolarizzazione. Lo studio ha anche lo scopo di andare a verificare se queste modificazioni placentari possano influenzare sullo stato di salute del cucciolo alla nascita, nonché mettere in relazione parametri clinici del neonato, quali Apgar score, temperatura, glicemia e lattatemia a alla nascita e due ore da questa, tra di loro e con il tipo di parto svolto (spontaneo, cesareo d'urgenza e cesareo programmato).

8 MATERIALE E METODI

Sono stati raccolti, presso il Servizio Clinico dei Piccoli Animali (SERCLIPA) Unità di Riproduzione del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna, dati clinici e campioni istologici di natura placentare provenienti da 33 cagne sottoposte a taglio cesareo, d'urgenza o programmato, e parto naturale, per un totale 144 cuccioli, nel periodo di tempo compreso tra gennaio 2013 e dicembre 2015.

I campioni istologici analizzati rientrati nello studio provengono da 8 parti , avvenuti nel periodo gennaio 2013 e novembre 2013, e corrispondono a 35 placenti.

La raccolta delle placente e dei dati clinici, della madre e dei cuccioli, è poi proseguita fino a dicembre 2015. Tutti i dati clinici raccolti fino a tale data sono rientrati nello studio, mentre l'analisi istologica delle placente raccolte dopo dicembre 2013 è attualmente in corso.

Alle femmine gravide condotte in visita è stato eseguito un esame obiettivo generale e particolare per accertare il loro buono stato di salute.

Hanno completato la visita la raccolta di dati anamnestici quali (Fig. 7.1): età, numero di gravidanze, durata della gravidanza (giorni), problemi relativi alla gravidanza in atto o alle

gravidanze precedenti, vaccinazioni attuate, trattamenti antiparassitari eseguiti , tipo di alimentazione (casalinga o commerciale), e peso corporeo.

CAGNA _____ DATA _____

Razza _____	Età _____	Peso _____ kg
Proprietario _____		
Gravidanza n. _____	Durata: _____ gg	NOTE _____
Antiparassitari: _____	data _____	
Vaccinazioni: _____	data _____	
Alimentazione _____		
Problemi durante precedenti gravidanze: _____		
Problemi durante questa gravidanza: _____		
Monitoraggio della gravidanza: _____		

Fig. 7.1 Scheda raccolta dati anamnesi madre.

I tipi di parto che sono rientrati nello studio sono : il cesareo d’urgenza, il cesareo programmato e il parto spontaneo.

L’intervento cesareo, d’urgenza e programmato, è stato eseguito in anestesia generale. L’induzione anestesiológica è stata ottenuta per via endovenosa con Propofol senza premedicazione. E’ seguita l’ intubazione tracheale del paziente e il mantenimento dell’anestesia in Isoflurano. Il taglio cesareo è avvenuto mediante accesso celiotomico, a cui è seguita l’esteriorizzazione dell’utero gravido. Il viscere è stato inciso a cavallo tra il corpo e una delle due corna per consentire l’estrazione di tutti i nati attraverso un’unica apertura. Sono seguite la sutura dell’organo cavo con due piani introflettenti, oppure, qual’ora richiesto dal proprietario, l’ovarioisterectomia come da tecnica di routine. Dopo l’estrazione dei nati un’equipe di rianimazioni ha provveduto tempestivamente a liberare i cuccioli dagli invogli fetali, a liberare le loro vie aeree dai liquidi placentari (mediante pompette o siringhe) ad asciugarli e stimolarne i primi atti respiratori frizionando delicatamente la cute del torace.

Sono stati inoltre raccolti dati clinici quali: lattatemia e glicemia della madre a tempo zero (all'inizio della fase espulsiva o nel caso del cesareo prima dell'induzione), alla fine del parto (dopo l'espulsione dell'ultimo cucciolo o in caso cesareo dopo l'estubazione) e dopo 2 ore da questo.

Tali dati clinici, anche se non sono stati analizzati nel presente lavoro, fanno parte di un diario di ricerca che consentirà in futuro il proseguimento delle indagini sull'unità fetoplacentare.

Di ogni cucciolo è stata compilata una scheda di nascita (Fig.7.2). All'interno della scheda sono stati riportati, per ogni cucciolo, il punteggio APGAR (eseguito entro 5 minuti dalla nascita), il peso corporeo, la temperatura rettale, il peso della placenta, il rapporto peso placenta/ peso cucciolo (PPR in %), la lattatemia e la glicemia a tempo zero (alla nascita), dopo 2 ore e dopo 24 ore. A tal fine sono stati utilizzati: una bilancia pesa alimenti digitale, un termometro pediatrico digitale, un lattametro (Lactate-Scout Analyzer) e un glucometro (Abbott Diabetes Care Optimum Exceed) (Fig.7.3)

CUCCIOLO 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 programm. 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 _____

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 _____

es. macroscopico: _____

NOTE: _____

Fig.7.2 Scheda raccolta dati clinici cucciolo e punteggio Apgar.



Fig. 7.3 Strumenti per la valutazione clinica dei cuccioli.

La scheda di nascita è stata completata con le valutazioni successive inerenti la sopravvivenza del cucciolo a 24 , 48 ore e ad una settimana di vita. I cuccioli sono pertanto stati classificati sulla base dei risultati in : nati vivi e vivi a 7 giorni (Gruppo 1), morti entro 7 giorni o (Gruppo 2), nati morti (Gruppo 3).

La numerosità di ciascuna cucciolata è stata comparata con i dati di numerosità presenti in bibliografia per ciascuna razza (K. S. Borge.et al., 2011) (Fig 7.4). Quando la numerosità è stata maggiore del valore medio di razza, tale cucciolata è stata definita grande (G), le cucciolate invece caratterizzate da una numerosità inferiore a quanto riportato dai medesimi autori, la cucciolata è stata definita piccola (P). Per quanto riguarda le razze non citate da Borge et al., (2011), che nel nostro caso sono il Pastore Maremmano e il cane da montagna dei Pirenei, la dimensione della cucciolata è stata definita grande o piccola coerentemente con il peso vivo della razza e criterio di affinità con altre razze appartenenti al medesimo gruppo morfologico definito dalla Fèdèration cynologique internazionale.

Mean litter size at birth in the 100 most popular breeds based on reported litters from breeders to the Norwegian Kennel Club during 2006 and 2007.

Breed	n	Mean	SEM	Range	Breed	n	Mean	SEM	Range
Rhodesian Ridgeback	30	8.9	0.6	1-15	Welsh Corgi (Pembroke)	28	5.5	0.4	1-9
Leonberger	46	8.4	0.5	1-15	Dachshund	358	5.4	0.1	1-13
Dalmatian	46	8.4	0.5	1-15	Bulldog	37	5.4	0.4	1-10
German Shorthaired Pointer	64	8.3	0.4	1-15	American Cocker Spaniel	95	5.3	0.2	1-10
Flat Coated Retriever	120	8.3	0.3	1-15	Norwegian Elkhound Black	65	5.2	0.3	1-11
Dogue De Bordeaux	26	8.1	0.8	2-17	Tibetan Terrier	28	5.2	0.3	1-9
Gordon Setter	219	7.6	0.2	1-16	Collie (Rough)	101	5.2	0.2	1-10
Swedish Elkhound	70	7.5	0.3	1-14	Finnish Lapphund	24	5.2	0.3	2-9
Golden Retriever	291	7.5	0.2	1-14	Siberian Husky	88	5.1	0.2	1-14
Rottweiler	214	7.4	0.2	1-14	Border Terrier	27	5.1	0.4	1-9
Norwegian Hound	41	7.4	0.6	1-17	Petit Basset Griffon Vendéen	35	5.1	0.4	1-10
English Springer Spaniel	74	7.3	0.3	1-13	Lhasa Apso	34	4.9	0.3	1-9
German Wirehaired Pointer	53	7.3	0.4	1-14	Norwegian Buhund	36	4.9	0.3	1-8
Pomer	83	7.2	0.3	1-12	Basenji	22	4.8	0.4	1-8
Irish Setter	145	7.1	0.2	1-13	French Bulldog	35	4.7	0.3	1-8
Finnish Hound	74	7.1	0.3	1-13	Miniature Schnauzer	205	4.7	0.1	1-10
Great Dane	29	7.1	0.6	1-13	Manchester Terrier	21	4.7	0.3	2-7
Dobermann	45	7.0	0.4	1-13	Bichon Frise	192	4.6	0.1	1-10
Poodle (Standard)	103	7.0	0.2	2-12	Icelandic Sheepdog	23	4.5	0.3	2-6
Giant Schnauzer	42	7.0	0.5	1-14	Jack Russel Terrier	138	4.4	0.1	1-10
Schnauzer	28	7.0	0.4	2-11	Cairn Terrier	182	4.4	0.1	1-8
Labrador Retriever	223	6.9	0.2	1-13	Dachshund (Miniature)	144	4.4	0.1	1-8
Alaskan Malamute	49	6.9	0.3	2-11	Chow Chow	36	4.4	0.4	1-9
Small Munsterlander	24	6.9	0.5	3-13	Bichon Havanais	73	4.3	0.2	1-9
St. Bernard	45	6.8	0.5	1-18	Chinese Crested	133	4.3	0.2	1-9
Eurasier	22	6.7	0.6	1-13	Miniature Pinscher	76	4.3	0.1	1-7
Basset Hound	21	6.7	0.8	1-11	Danish-Swedish Farmdog	35	4.2	0.3	1-8
Lagotto Romagnolo	26	6.7	0.3	4-12	Pug	120	4.2	0.2	1-8
Boxer	139	6.6	0.2	1-12	Shih Tzu	95	4.2	0.2	1-9
Nova Scotia Duck Tolling Retriever	74	6.6	0.2	2-12	Cavalier King Charles Spaniel	439	4.1	0.1	1-15
Newfoundland	57	6.5	0.4	1-12	Boston Terrier	46	4.1	0.3	1-8
Hamilton Hound	24	6.5	0.5	3-11	Shetland Sheepdog	292	3.9	0.1	1-8
Bernese Mountain Dog	137	6.4	0.3	1-15	Japanese Spitz	91	3.9	0.1	1-7
English Setter	266	6.4	0.1	1-13	Coton de Tulear	27	3.8	0.3	1-7
Brittany	53	6.4	0.3	1-10	Tibetan Spaniel	312	3.8	0.1	1-8
Belgian Shepherd Dog (Groenendael)	29	6.3	0.4	2-11	West Highland White Terrier	37	3.7	0.3	1-8
Belgian Shepherd Dog (Tervueren)	52	6.2	0.4	1-11	Poodle (Medium)	105	3.7	0.2	1-10
Samoyed	41	6.2	0.4	1-12	Finnish Spitz	23	3.7	0.2	2-6
Swedish Dachsbracke	84	6.1	0.3	1-12	Yorkshire Terrier	35	3.5	0.3	1-6
German Shepherd Dog	465	6.1	0.1	1-14	Papillon	166	3.3	0.1	1-7
Whippet	47	6.1	0.3	1-10	Phalène	43	3.3	0.2	1-6
Border Collie	323	6.0	0.1	1-16	Italian Greyhound	34	3.3	0.3	1-6
Irish Soft Coated Wheaten Terrier	57	5.8	0.2	1-10	Shiba Inu	42	3.3	0.3	1-7
Cocker Spaniel	174	5.7	0.2	1-14	Dachshund (Rabbit)	35	3.3	0.2	1-6
Staffordshire Bull Terrier	82	5.6	0.2	1-12	Norwegian Lundehund	46	3.2	0.2	1-5
Greenland Dog	36	5.6	0.4	1-10	Chihuahua	269	3.2	0.1	1-7
Australian Terrier	22	5.5	0.4	1-8	Poodle (Miniature)	151	3.0	0.1	1-8
Bull Terrier	36	5.5	0.4	1-9	Norfolk Terrier	25	2.5	0.2	1-5
Norwegian Elkhound Grey	390	5.5	0.1	1-12	Pomeranian	179	2.4	0.1	1-6
Beagle	113	5.5	0.2	1-10	Poodle (Toy)	100	2.4	0.1	1-4

Fig.7.4 Numerosità media di cucciolate in diverse razze (K.S.Borge et al., 2011).

Dopo il secondamento (nel caso di parti naturali) o l'estrazione chirurgica (nel caso di tagli cesarei), le placente sono state pesate e inserite in contenitori ermetici per campioni patologici con formalina al 10% neutra tamponata. Ciascun contenitore con il rispettivo campione è stato poi singolarmente identificato. I campioni sono stati processati presso il Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, dove

sono state eseguite le valutazioni istopatologiche. Durante il periodo di studio, otto cagne gravide sono state incluse nella ricerca, esono andate in contro a parto vaginale spontaneo (1), taglio cesare programmato (2) o taglio cesareo d'urgenza (5). Un totale di 35 placentate da otto cucciolate sono state incluse nello studio (fig). Sono state esaminate 23 placentate ottenute da cuccioli del Gruppo 1, 7 placentate da cuccioli del Gruppo 2, e 6 placentate da cuccioli del Gruppo 3.

I campioni, tolti dalla formalina, sono stati sezionati con un bisturi per ottenere delle porzioni rappresentative. Per ciascuna placenta sono state eseguite due sezioni trasversali al centro del labirinto, presi ai due poli opposti della cintura placentare (Fig 7.5)

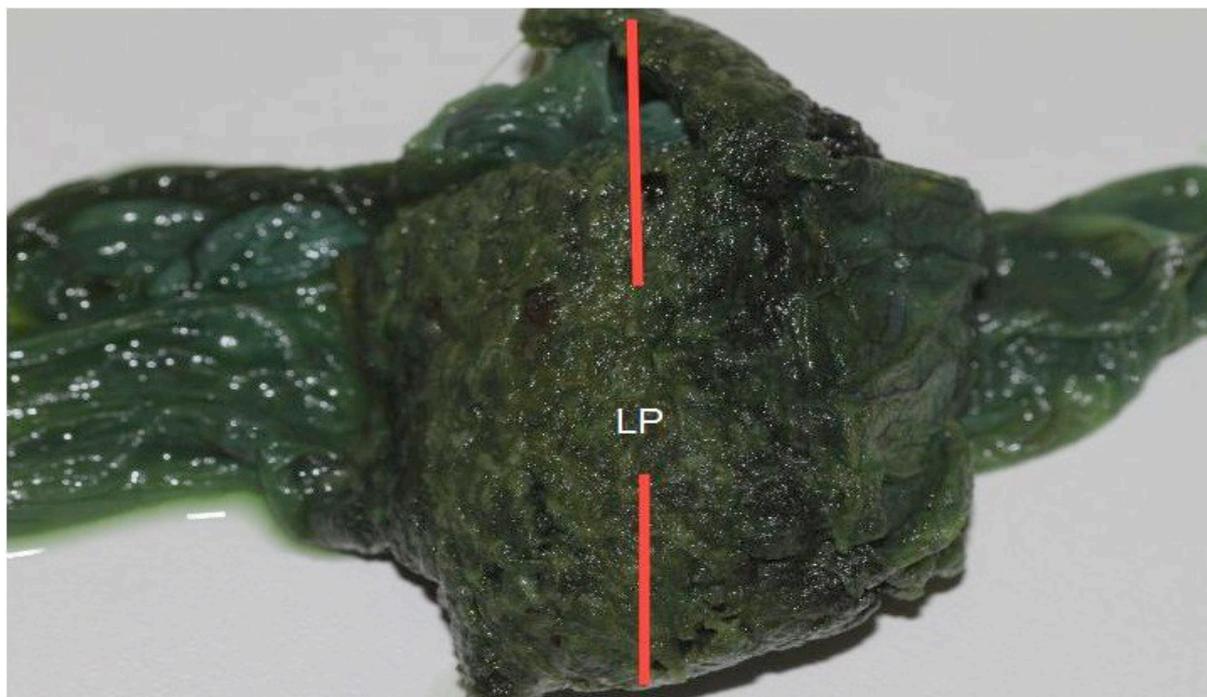


Fig. 7.5 Sezioni trasversali del labirinto placentare.

I campioni 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 all'inclusione in paraffina. Nello specifico in una prima fase i campioni sono stati disidratati in soluzioni crescenti di alcool etilico e portati a xilolo con sistema automatico (Intelsint RVG/1). Successivamente l'inclusione in paraffina è avvenuta con sistema manuale (Tissue-Tek). Dai blocchetti di tessuto così ottenuti sono state tagliate, tramite microtomo,

sezioni di 4 micron di spessore. Le sezioni sono state sparaffinate, cioè tramite solventi viene eliminata la paraffina, idratate, successivamente sono state colorate con Ematossilina-Eosina, infine di nuovo disidratate in una serie di alcool a concentrazione crescente, portati a xilolo e montati con DPX.

I vetrini sono stati visionati con microscopio ottico su cui è stata montata una macchina fotografica digitale Leica DFC 320 DMLB (Leica, Wetzlar, Germania). Sono poi state acquisite 5 fotografie di campi a 40X , non adiacenti e casuali, del labirinto placentare. Il software che è stato utilizzato per l'acquisizione dell'immagine è InfranView. Le foto sono state stoccate come immagini JPEG (dimensioni 2088x1550, risoluzione 96x96 dpi RGB 12MB) (Fig.7.6).

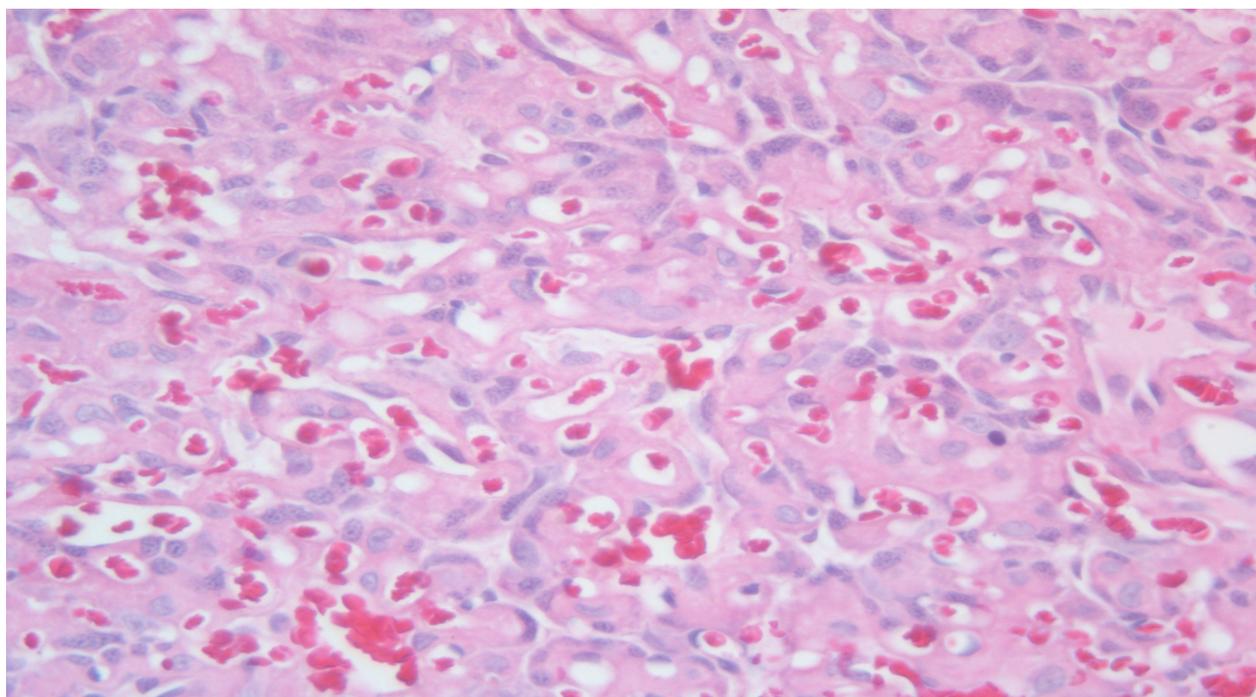


Fig.7.6 Foto 40x del labirinto placentare (colorazione Ematossilina-Eosina) scattata con fotocamera digitale montata su microscopio ottico.

Per l'esecuzione dell'analisi dell'immagine è stato utilizzato un software opensource ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Il software ImageJ permette di eseguire svariate funzioni nell'analisi delle immagini microscopiche e ultrastrutturali.

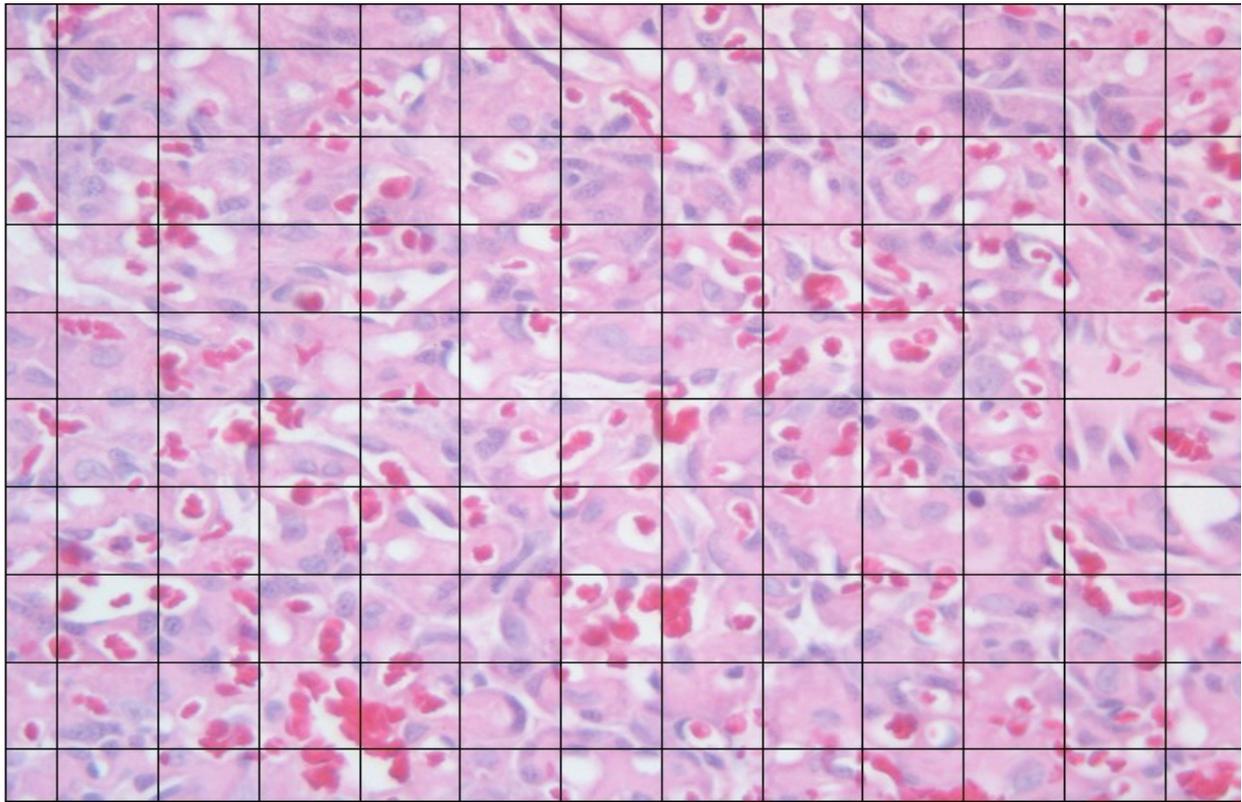


Fig.7.7 Griglia sull'immagine istologica del labirinto placentare.

Nel nostro caso si è posto particolare attenzione all'Indice di Capillarizzazione Placentare, inteso come la valutazione della densità capillare mediante sovrapposizione di una griglia di dimensioni note (griglia a maglie quadrate di 22 micron per lato), su un set di immagini istologiche (Fig.7.7). In seguito sono stati contati i capillari giacenti sugli incroci delle maglie (108 incroci totali) mediante plugin cell-counter(Fig. 7.8). Per ciascun preparato istologico è stato ottenuto un valore densità capillare/campo.

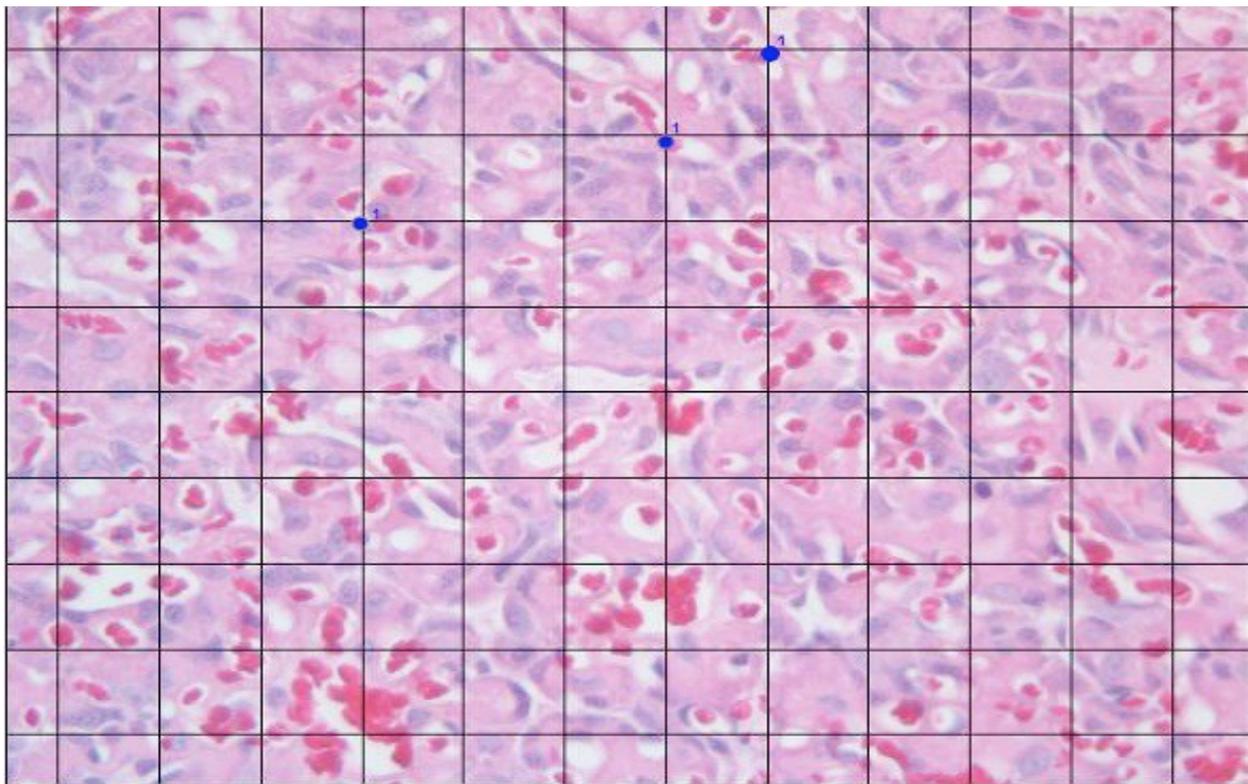


Fig7.8 Conteggio dei capillari giacenti sulle intersezioni delle maglie della griglia..

Analisi statistiche dei dati istologici

La distribuzione delle variabili è stata saggiata utilizzando il test Shapiro - Wilk ; confronti multipli di dati normalmente distribuiti sono state effettuate con ANOVA e il test post-hoc; confronti multipli di dati con distribuzione non normale sono state effettuate con test non parametrico di Kruskal-Wallis e confronti a coppie. Confronti a coppie di distribuzione normale dei dati è stata effettuata con il test T student, mentre i confronti a coppie di dati non normalmente distribuiti è stata effettuata con il test di Mann-Whitney U. Test . Spearmans rho test è stato utilizzato per analizzare la correlazione tra i dati non normalmente distribuiti. Variabili dicotomiche sono state analizzate con il test chi-quadrato. La significatività statistica è stato impostato come $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata eseguita con Statistica 8 (Statsoft-Dell TX-USA).

Nelle analisi delle placente sono inoltre stati considerati le seguenti variabili: la presenza di cellule infiammatori e la presenza di degenerazione / necrosi. Queste variabili sono state considerate variabili dicotomiche (0 = no; 1 = presenza). Le lesioni placentari rilevate

all'esame istologico sono state definite in base alla loro estensione in : lobulari (o focali) , multilobulari (o multifocali) o diffuse.

Analisi statistiche dei dati clinici

Il t- test è stato utilizzato per valutare l'eventuale presenza di una differenza statisticamente significativa tra:

- lattatemia misurata alla nascita (t0) e dopo 2 h (t2)
- glicemia misurata alla nascita (t0) e dopo 2 h (t2).

Il test ANOVA ad 1 via è stato utilizzato per valutare la presenza di una differenza statisticamente significativa tra le diverse tipologie di parto (spontaneo, assistito/indotto, cesareo programmato e cesareo d'urgenza) per i seguenti parametri:

- lattatemia misurata al parto (t0)
- lattatemia misurata a 2 h dal parto (t2)
- glicemia misurata al parto (t0)
- glicemia misurata a 2 h dal parto (t2)
- temperatura
- Apgar Score

Il test chi quadrato è stato impiegato per verificare la presenza di una differenza significativa tra le frequenze dei cuccioli sopravvissuti e non sopravvissuti dopo 24 h nelle diverse tipologie di parto

Il test ANOVA ad 1 via è stato utilizzato per valutare la presenza di una differenza statisticamente significativa tra cuccioli nati vivi, nati morti, morti dopo 2h e dopo 24 h dalla nascita, per i seguenti parametri:

- rapporto peso cucciolo/peso placenta (%)
- rapporto peso madre/peso cucciolo (gr).

9 RISULTATI

Risultati istologici

Una placenta ottenuta da un nato morto era autolitico, e non è stata inclusa nello studio. È stato possibile evidenziare istologicamente che tutte le placente esaminate si erano normalmente sviluppate secondo l'età gestazionale. Le lesioni più frequentemente riscontrate sono state le lesioni degenerative-necrotiche con distribuzione lobulare (focale) o multilobulare (confluenti multifocale o multifocale). I soggetti del gruppo 1 hanno mostrato lesioni degenerative-necrotiche in 12 casi su 23 placente esaminate, in 9 casi sono state lobulari, in 3 casi multilobulari. Tra gli individui del gruppo 2, 5 su 7 placente hanno mostrato lesioni degenerative-necrotiche, 3 delle quali erano lesioni lobulari e 2 multilobulari. Infine, tutte le placente del Gruppo 3 sono state caratterizzate da lesioni degenerative-necrotiche, in 1 caso distribuzione lobulare, in 4 con distribuzione multilobulare. Il confronto dei dati provenienti da placente con alterazioni degenerative-necrotiche con distribuzione multilobulare tra i tre gruppi ha evidenziato una differenza statisticamente significativa (Pearson Chi quadrato = 9.67; $p = 0.008$). Occasionalmente queste lesioni sono state accompagnate dalla presenza di cellule infiammatorie intravascolari nei capillari materni, costituite da linfociti e in misura minore neutrofili. I leucociti erano presenti in 4 placente del Gruppo 1, in una placenta del Gruppo 2 e in 2 placente del Gruppo 3. In assenza di lesioni necrotiche o degenerative non sono state ritrovate cellule infiammatorie. Inoltre sono state rilevate calcificazioni focali all'interno del labirinto delle placente di 8 cuccioli del Gruppo 1, in 3 del Gruppo 2 e in 3 del Gruppo 3. Tra gli altri reperti istologici sono stati rilevati: trombosi delle arterie materne in 1 placenta del Gruppo 2 e due del Gruppo 3 (nati morti), calcificazioni del mesenchima trofoblastico in 1 placenta del Gruppo 1, in 2 del Gruppo 2, e in 1 del Gruppo 3. Sono stati evidenziati ematomi (simile alla zona dell'ematoma marginale) in 2 placente del Gruppo 1, in 2 del Gruppo 2 e in 1 del Gruppo 3. Istologicamente, i lobuli coinvolti dalla necrosi coagulativa (infarto) sono stati caratterizzati da lesioni ben circoscritte, il contorno delle lamelle è stato mantenuto (Figura a; b).

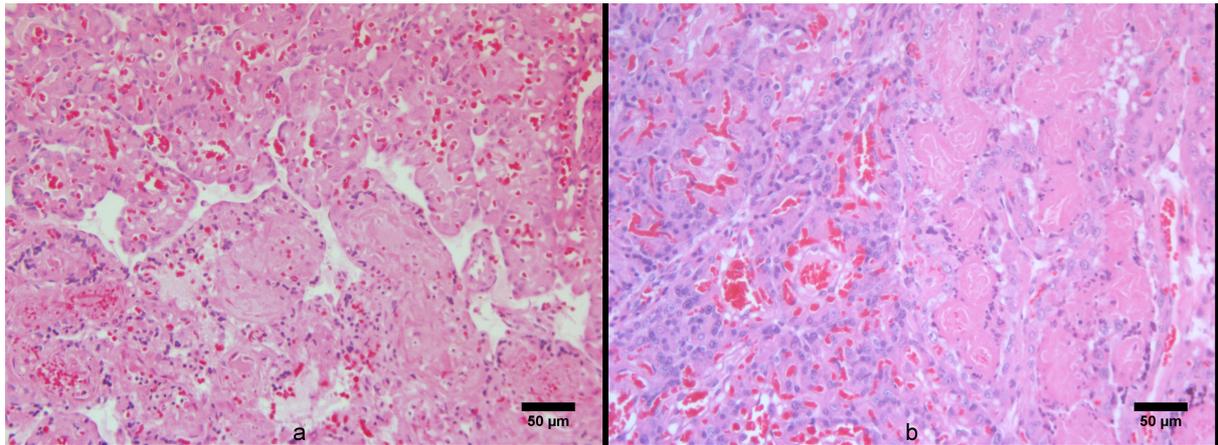


Fig a e b: Lobuli coinvolti da necrosi coagulativa (Infarto)

Le cellule del sinciziotrofoblasto erano omogeneamente eosinofile, con perdita del dettaglio cellulare, condensazione della cromatina (picnosi) o frammentazione della cromatina (carioressi) (necrosi coagulativa); le cellule del citotrofoblasto hanno mostrato diversi gradi di alterazioni degenerative o hanno mostrato necrosi coagulativa (Figura a, b). Il citotrofoblasto degenerato è stato caratterizzato da bordi cellulari frastagliati, irregolari e vacuolizzazione citoplasmatiche. Sono presenti multifocali stravasi di eritrociti (emorragia). L'endotelio dei capillari materni non era visibile (necrosi coagulativa). I capillari contenevano linfociti materni, monociti e neutrofilo, con fili di fibrina. Lo spazio subendoteliale era moderatamente aumentato con la presenza di spazi liberi (segni di edema) (Figura c). Il primo tipo di calcificazione è di tipo focale con disposizione radiale di materiale granulare basofilo circondato dalle cellule del sinciziotrofoblasto e citotrofoblasto (Figura d).

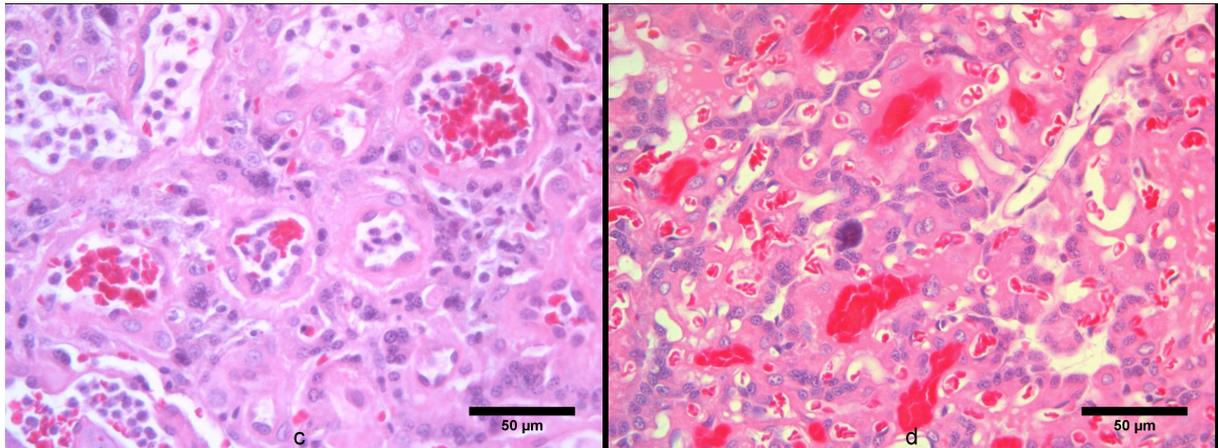


Fig c : Segni di edema sub-endoteliale; Fig d: Primo tipo di calcificazione focale.

Il secondo tipo di calcificazione è di tipo lineare , spesso 1-3 mm, proveniente dalla faccia fetale del labirinto e circondato da cellule citotrofoblasto degenerate , con presenza di scarse quantità di detriti necrotici amorfi eosinofili. Un terzo tipo di calcificazione è rappresentata da materiale basofilo granulare sparso frammentato e incorporato nel collagene maturo contenente fibroblasti stellati, delineati da un bordo di cellule del citotrofoblasto. Il confronto tra la densità capillare l'outcome dei tre gruppi non ha evidenziato differenze ($p = 0,806$). Invece le placenta ottenuti da cucciolate poco numerose ($n = 16$) hanno una densità capillare di $12,72 \pm 3,32$, mentre quelli ottenuti da cucciolate più numerose ($n = 18$) hanno una densità di $16,94 \pm 2,96$, la differenza è quindi significativa ($p = 0,0004$) (Fig.9.1 - 9.4).

Madre			Cucciolata			
Nome	Razza	Peso (kg)	Totale Nati	Numero di placentate analizzate	Numerosità media della cucciolata per razza	Numerosità della cucciolata "Grande/Piccola"
Easy	Shetland	6,5	3	3	3,9	P
Egle	Boxer	35,8	11	11	6,6	G
Brienne	P.dei Pirenei	46	5	5	?	P
Nebbia	Maremmano	39	5	5	?	P
Shila	Chihuahua	2	1	1	3,2	P
Briciola	Chihuahua meticcio	4,2	2	1	3,2	P
Sushi	Boston terrier	8,2	3	3	4,1	P
Gemma	Labrador	51	12	7	6,9	G

Fig 9.1 La presente tabella riporta il segnalamento delle cagne incluse nello studio e i risultati circa il numero dei parti e delle placentate analizzate; per ciascuna razza è inoltre riportata la numerosità media della cucciolata per razza, in base alla quale la cucciolata è stata definita grande (G) o piccola (P).

MADRE	Placenta N.	Densità di capillarizzazione placentare
Easy	1	autolisi
Easy	2	15,6
Easy	3	14,6
Egle	1	18,6
Egle	2	17,6
Egle	3	20,0
Egle	4	23,4
Egle	5	19,2
Egle	6	12,2
Egle	7	15,6
Egle	8	20,6
Egle	9	13,6
Egle	10	14,4
Egle	11	17,2
Brienne	1	4,2
Brienne	2	10,6
Brienne	3	11,4
Brienne	4	14,4
Nebbia	1	12,6
Nebbia	2	14,2

MADRE	Placenta N.	Densità di capillarizzazione placentare
Nebbia	3	6,2
Nebbia	4	12,2
Nebbia	5	14,8
Shila	1	14,8
Briciola	1	16,2
Sushi	1	14,8
Sushi	2	14,2
Sushi	3	12,8
Gemma	1	13,0
Gemma	2	15,2
Gemma	3	15,8
Gemma	4	19,6
Gemma	5	17,0
Gemma	6	14,2
Gemma	7	17,8

Fig 9.2 La presente tabella riporta i risultati dell'analisi dell'indice di capillarizzazione per ciascuna placenta esaminata.

Numerosità cucciolata	N	Media	Dev.standard	Min	Max	Range
Piccola	16	1.272.500	3.324.154	1.620.000	4.200.000	1.200.000
Grande	18	1.690.000	2.961.915	1.220.000	2.340.000	1.120.000

Fig. 9.3 Densità della capillarizzazione placentare in funzione della numerosità della cucciolata (Piccola o Grande). I risultati sono riportati come valore medio, deviazione standard, valori minimo e massimo e range.

	SS	df	MS	SS	df	MS		
	Effect	Effect	Effect	Error	Error	Error	F	p
DENS CAP	1.476.476	1	1.476.476	3.148.900	32	9.840.313	1.500.437	.000499

Fig 9.4 La tabella riporta l'analisi della varianza nella popolazione di studio. I risultati sono stati ritenuti significativi per $p < 0.05$.

Risultati clinici

Il t-test ha rivelato la presenza di una differenza statisticamente significativa tra lattatemia misurata a t0 (media 6,79 \pm 4,31) e quella misurata a t2 (media 3,36 \pm 2,76) ($p < 0.0001$) indipendentemente dal tipo di parto. Per la glicemia non è stata riscontrata alcuna differenza significativa (media t0 96,35 \pm 47,30; media t2: 88,19 \pm 40,45).

L'ANOVA ad 1 via ha riscontrato una differenza statisticamente significativa tra tre tipi di parto (non è stato incluso il parto assistito/indotto per un numero troppo esiguo di campioni) per :

- La lattatemia t0, che è significativamente più alta ($p = 0,0005$) nei cuccioli nati con parto spontaneo rispetto ai due tipi di cesareo, tra i quali non c'è differenza;
- La lattatemia t2, ($p = 0,0073$) come sopra;
- La glicemia t0, che è significativamente più alta ($p = 0,026$) nei cuccioli nati con cesareo programmato rispetto a quelli nati con cesareo d'urgenza e parto spontaneo;
- La temperatura è statisticamente più alta ($p < 0,0001$) nei cuccioli nati con parto spontaneo rispetto a quelli nati con cesareo sia in quello programmato che in quello d'urgenza;

L'ANOVA ad 1 via non ha riscontrato differenze per la glicemia t2 e l'Apgar Score tra i differenti tipi di parto.

Il chi quadrato non ha rilevato alcuna differenza nella frequenza dei cuccioli sopravvissuti e non sopravvissuti dopo 24 h in base alle diverse tipologie di parto. Pertanto almeno si può affermare che la probabilità di sopravvivere a 24 h dal parto è indipendente dalla tipologia di parto. L'ANOVA ad 1 via ha rivelato che esiste una differenza statisticamente significativa ($p = 0,009$) tra il rapporto peso cucciolo/peso placenta per i cuccioli nati vivi e quelli che sono morti dopo 2 h. (i morti hanno una placenta in media più pesante). Per il rapporto peso madre /peso cucciolo in relazione all'exitus non è stata riscontrata differenza significativa.

10 DISCUSSIONI

In medicina umana le patologie placentari hanno una rilevante importanza clinica per quattro motivi principali: forniscono risultati immediati e rilevanti per la cura della madre o del bambino; forniscono risultati predittivi di possibili recidive che quindi possono indirizzare le cure nelle successive gravidanze; forniscono diagnosi che aiutano a spiegare eventuali esiti negativi di gravidanza; sono, inoltre, di importante aiuto nelle indagini medico-legali inerenti la mortalità perinatale e morbilità a lungo termine (Redline, 2014). Si consideri, inoltre, che la placenta è l'unico esempio di campione in grado di fornire informazioni su due pazienti contemporaneamente, madre e conceptus (Lewis e Benirschke 2007). Anche in medicina veterinaria, si può sostenere che l'esame istopatologico placentare può fornire dati clinicamente utili simili a quelli descritti. Nel presente studio vengono descritte lesioni istologiche placentari, le quali vengono interpretate anche sulla base delle possibili cause che possano averle generate. La placenta cresce rapidamente e si modifica contemporaneamente allo sviluppo del feto. La placenta è l'interfaccia tra madre e conceptus. Anche se è un organo provvisorio, è un tessuto plastico e poliedrico che svolge una serie di funzioni importanti durante la gravidanza, tra le quali: l'ancoraggio alla parete uterina, lo sviluppo del feto, la tolleranza immunitaria materna, lo scambio di gas, di nutrienti e la rimozione dei prodotti di scarto. Inoltre, come una barriera, protegge il feto da sostanze xenobiotiche e rilascia una serie di ormoni steroidei e citochine (Migliano et al., 2006; Aralla et al., 2013; Furukawa et al., 2014). Nell'architettura della placenta del cane è importante descrivere e interpretare la distribuzione delle lesioni infartuali per definire il coinvolgimento focale o multifocale (lobulare o multilobulare). La lesione patologica placentare più frequente, e caratterizzata da un'estensione variabile, è l'infarto (Baergen, 2005). La mineralizzazione del mesenchima del trofoblasto è invece una lesione caratterizzata da andamento lineare. Le lesioni infartuali sono caratterizzate da un danno iperacuto contraddistinto da degenerazione e necrosi principalmente a carico delle cellule del sinciziotrofoblasto, o danno subacuto, con necrosi coagulativa di entrambi i tipi di cellule del trofoblasto. Questa evidenza suggerisce che le cellule del citotrofoblasto sono più resistenti ad ipossia / anossia, soprattutto alla luce del fatto che delineano le lacune di sangue dell'ematoma marginale. La stessa osservazione è stata suggerita da Steiger e i suoi colleghi (Steiger et al., 2006). L'infarto placentare, se lobulare, non può avere conseguenze sui ripercussioni sul feto, grazie all'efficienza degli

scambio del parenchima placentare residuo, la restante parte è infatti in grado di svolgere una funzione di compensazione (Prakash Telegu e Green , 2008). Nel presente studio, l'infarto placentare multilobulare era significativamente più frequente nei gruppi 2 e 3 cuccioli. Di conseguenza, l'estensione della lesione può aver influenzato l'esito della gravidanza. Il modello di distribuzione e l'estensione della lesione devono sempre essere considerati e caratterizzati. Pertanto, l'individuazione di infarti lobulare deve essere considerata una lesione accidentale, mentre la presenza di infarti multilobari, se in concomitanza di trombosi di arterie staminali , deve essere considerata un importante lesioni placentare che influenza la morbilità neonatale. La necrosi coagulativa placentare, riscontrata in concomitanza di placentiti più o meno gravi , è causata nel cane dall'azione di alcuni agenti infettivi: *Brucella spp*, *Leptospira spp*, *Streptococcus canis*, *Canine Herpesvirus*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania spp*. Ma le descrizioni istologiche in questi casi sono poche (Hashimoto et al., 1979;Dubey et al., 2005; Foster et al., 2013; Gyuranecz et al., 2011;Srivastava et al., 2013). Sono stati condotti studi sperimentali sui cani in stato di gravidanza , in cui il cane è stato preso come modello per la preeclampsia umana. In questi studi sono stati descritti gravi e diffusi infarti placentari indotti da ischemie prolungate. Tali lesioni apparivano come foci di infarto emorragico con picnosi e perdita di dettaglio cellulare di grandi aree trofoblastiche (Abitbol et al., 1976). Un ulteriore studio ha esaminato i cambiamenti istologici e ultrastrutturali della placenta di cagne in cui è stata interrotta farmacologicamente la gravidanza; a differenza del presente studio, le placente esaminate non erano a termine (circa 30 giorni di gravidanza). Sono stati identificati infarti placentari ma senza evidenti lesioni trombotiche; è stato anche descritto che le cellule del sinciziotrofoblasto, coinvolte inizialmente da lesioni necrotiche degenerative, hanno poi risposto successivamente con una proliferazione del citotrofoblasto (Steiger et al., 2006). Come già detto, i pochi studi presenti sulla placenta del cane sono effettuati su campioni patologici raccolti nell'ambito di disordini riproduttivi spontanei e indotti (aborto). Il presente studio ha invece lo scopo di caratterizzare le lesioni in soggetti convenzionali. L'aumento del numero di leucociti intravascolari non sembra essere una lesione primaria, ma molto probabilmente è indotta da cambiamenti degenerativi necrotici. Di conseguenza, le lesioni descritte potrebbero essere chiamate infarti placentari acuti o subacuti, con distribuzione lobulare o multilobulare. Una lesione che è stata rilevata in ben tre diversi aspetti è la calcificazione: il primo aspetto può essere definito

microfocale fisiologico, si manifesta a livello della placenta in varie specie, ed è interpretato come reperto accidentale. La mineralizzazione si verifica perché il sangue fetale è relativamente più acido di sangue materno (Haschek et al., 2010). Va sottolineato che tale constatazione non è mai stata associata ad eventi necrotici degenerativi e / o infiammatoria. Il secondo tipo di mineralizzazione, lineare, è stata sempre accompagnata da una degenerazione / necrosi e si riscontra sempre in feti con un esito negativo o nati morti. Questo secondo tipo di calcificazione è l'esito di una mineralizzazione distrofica post necrosi. Nel terzo tipo di mineralizzazione, la presenza di focolai multipli della calcificazione nello stroma trofoblastico è di difficile interpretazione, ma non si può escludere che possa essere uno stadio di evolutivo di calcificazioni lineari estese, perché adiacente a focolai multipli di mineralizzazione lineare. Il rapporto peso placenta/peso cucciolo non è mai stato studiato, alcuni studi sono presenti sul cane beagle, concentrando l'attenzione però esclusivamente sul peso e sulle misure morfometriche di placenta e cuccioli (Fukuda e Matsuoka, 1979) . I capillari hanno un ruolo cruciale nel trasporto di ossigeno e nutrienti, e nel presente studio è stato valutato, in termini di densità capillare per campo microscopico, ed è stato dimostrato che vi sono differenze quantitative nella densità microvascolare tra le diverse placente . L'evidenza più rilevante è stata " l'effetto dimensione cucciolata" sulla densità capillare, in cui è stata dimostrata una correlazione inversa tra densità capillare e numerosità della cucciolata. Infatti pare che una placenta più piccola aumenti le prestazioni di scambio per unità di area aumentando la capillarizzazione. Adottando un punto di vista comparativo, la densità microvascolare placentare è stata studiata in specie politociche di interesse veterinario (suina e ovina), in queste è noto che la densità capillare è maggiore nelle razze con maggiore prolificità, caratterizzate da placente piccole e aumentato rapporto feto placentare (Fowdwn et al., 2009). Alla luce di questi risultati, il presente studio ha identificato lo stesso adattamento di un aumento della densità capillare nelle placente più piccoli ottenute in cucciolate più numerose. L'angiogenesi o vasculogenesi, conferma che la placenta è un organo plastico, adattabili al mutare delle esigenze. Le prestazioni di scambio sono più elevato, per unità di superficie, nelle placente ottenute da cucciolate più numerose. In umana, la diminuzione della densità capillare della placenta è stato osservato nelle gravidanze contratte in età avanzata, in preeclamsia e diabete. Il fumo attivo o passivo e l'anemia materna pare invece causino un aumento della densità capillare placentare in risposta ad uno stimolo ipossico (Zigic et al.,

2010; Rath et al., 2011; Sankar et al., 2013). Nel nostro studio, abbiamo preso in considerazione giovani femmine adulte, di $4,4 \pm 2,1$ anni, con parametri clinici entro i limiti della norma, quindi la densità capillare placentare non dovrebbe essere stata influenzata dai fattori sopracitati (età, malattie). La densità capillare pare non influenzare l'esito della cucciolata, ma è più tosto la dimensione della cucciolata ad influenzare la densità capillare. Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato quello di descrivere le caratteristiche istologiche della placenta in cagne sane a termine gravidanza. Per definire l'estensione delle lesioni placentari più spesso rinvenute, gli infarti, sono stati scelti i termini di : infarto lobulare o multilobulare, in quanto il lobo è l'unità funzionale elementare della placenta nel cane. Gli infarti lobulari possono essere considerati reperti di scarso valore prognostico e non condizionanti l'esito della cucciolata, ciò confermerebbe le capacità compensative e adattative del restante parenchima placentare. Un danno placentare più esteso, come nel caso dell'infarto multilobulare, pare invece influenzare negativamente l'esito della cucciolata. Come per l'infarto lobulare, anche le mineralizzazioni di tipo focale pare non incidano sul buon esito della cucciolata. Al contrario mineralizzazioni lineari estese sono state rinvenute in placente di cuccioli nati morti o morti entro 7 giorni. Le lesioni trombotiche delle grandi arterie staminali materne sono state riscontrate nelle placente di cuccioli con prognosi infausta. Si desume quindi che è l'estensione della lesione, o la sua localizzazione in strutture di primaria importanza, a condizionare lo stato di salute del cucciolo. La raccolta dei parametri clinici del cucciolo al momento della nascita

11 CONCLUSIONI

Conclusioni sui dati clinici

- La lattatemia del cucciolo al momento della nascita è molto più alta di quella a due ore, indipendentemente dal tipo di parto. In condizioni di anaerobiosi, compresi gli stati di ipoperfusione placentare e tessutale, in linea generale, la produzione di energia passa per il metabolismo del piruvato che porta alla formazione del lattato e dell'acqua (Pang et al., 2007). Tale risultato è a testimonianza del fatto che la nascita è un processo che impegna il cucciolo in lavoro attivo svolto prevalentemente in anaerobio con la conseguente produzione di lattati. Il cucciolo si dimostra però in grado di innescare, successivamente alla nascita, meccanismi di compensazione che gli permettano di ristabilire i normali valori fisiologici.

-La glicemia del cucciolo alla nascita e dopo due ore non presenta differenze significative. Tale risultato fa riflettere sul fatto che nonostante il parto, e le ore immediatamente successive, comporti un lavoro metabolicamente attivo per il cucciolo con il conseguente consumo di energie, il neonato si dimostra in grado di mantenere un equilibrio glicemico attingendo alle proprie riserve di glicogeno epatico o “ibernandosi” in una condizione metabolica basale, quando necessario, per contenere le perdite energetiche.

-Mettendo in correlazione Apgar, lattatemia, glicemia e temperatura del cucciolo alla nascita e dopo due ore con il tipo di parto affrontato, spontaneo, cesareo d'urgenza e cesareo programmato, ne scaturisce che:

-la lattatemia alla nascita è molto più alta nel parto spontaneo rispetto agli altri tipi di parto; ciò dipende probabilmente dall'entità e dalla durata del lavoro svolto dal neonato per venire alla luce durante il parto vaginale. Il neonato entra in una condizione di ipossia durante l'attraversamento del canale del parto, all'interno del quale il suo corpo subisce forze compressive, inoltre il tempo che intercorre dalla nascita alla liberazione dagli involucri fetali da parte della madre è senza dubbio più lungo rispetto a quello che intercorre dall'estrazione alla liberazione durante un intervento cesareo.

-La glicemia alla nascita è più alta nel cesareo programmato rispetto agli altri tipi di parto,

mentre la glicemia a due ore non presenta differenze significative in tutti i parti; ciò induce a pensare che durante un cesareo programmato il cucciolo non svolge un lavoro metabolicamente attivo che richieda dispendio energetico. Inoltre, trattandosi di un intervento elettivo, il cucciolo non è indotto in una condizione di stress, che potrebbe essere alla base dell'aumento della cortisolemia fetale con conseguenti effetti iperglicemizzanti.

La temperatura alla nascita è più alta nel parto spontaneo rispetto agli altri tipi di parto; questo parametro è condizionato dalla temperatura materna in quanto i neonati alla nascita, e per le prime settimane di vita, non sono in grado di termoregolarsi autonomamente. Di conseguenza la nascita da una madre normotermica, come avviene in un parto spontaneo e non in un cesareo, in cui la cagna per effetto anestesiológico assume una temperatura inferiore a quella fisiologica, condiziona la temperatura del cucciolo. Inoltre, in un parto spontaneo la madre avvicina tempestivamente il neonato alle proprie mammelle per riscaldarlo per conduzione.

-Per quanto riguarda il punteggio Apgar non ci sono differenze significative tra i diversi tipi di parto.

-Il numero di cuccioli sopravvissuti a 24 ore non differisce nelle diverse tipologie di parto. Tale risultato è il frutto dell'elaborazione statistica dei dati raccolti presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna, ma non bisogna dimenticare che la sopravvivenza a 24 ore è un parametro che risente di molteplici variabili quali la tempestività di intervento e la qualità delle manovre ostetriche quando presenti. Pertanto tale risultato è da considerarsi inerente a questo studio e non valutabile come valore assoluto. Pertanto almeno presso il Servizio Clinico dei piccoli Animali Unità di Riproduzione del Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie di Bologna si può affermare che la probabilità di sopravvivere a 24 h dal parto è indipendente dalla tipologia di parto.

-Il rapporto tra peso della placenta e peso del cucciolo nei morti entro 2 dimostra che la placenta di questi cuccioli è più pesante.

Ne consegue che molti parametri clinici del cucciolo risentono dell'influenza del tipo di parto affrontato, ma la valutazione Apgar score e la sopravvivenza a 24 ore non evidenzia una differenza statisticamente significativa nei tre tipi di parto.

Per il rapporto peso madre /peso cucciolo in relazione all'exitus non è stata riscontrata differenza significativa

Conclusioni sui dati istologici

Nel presente studio, l'infarto placentare multilobulare era significativamente più frequente nei gruppi 2 e 3. Se ne deduce che l'estensione della lesione può aver influenzato l'esito della gravidanza. Pertanto, l'individuazione di infarti lobulari deve essere considerata un reperto accidentale, mentre la presenza di infarti multilobari, se in concomitanza di trombosi di arterie staminali, deve essere considerata una lesione placentare di rilievo che influenza la morbilità neonatale. Il secondo tipo lesione placentare descritta, la mineralizzazione lineare, è stata sempre accompagnata da una degenerazione / necrosi e si riscontra sempre in feti nati morti o morti entro 7 giorni. Questo secondo tipo di calcificazione è l'esito di una mineralizzazione distrofica post necrosi. I capillari hanno un ruolo cruciale nel trasporto di ossigeno e nutrienti, e nel presente studio è stato valutato l'indice di capillarizzazione placentare, in termini di densità capillare per campo microscopico, ed è stato dimostrato l' "effetto dimensione cucciolata" sulla densità capillare; ciò mette in evidenza una correlazione tra densità capillare e numerosità della cucciolata, a conferma della plasticità placentare sottolineando come la placenta sia un organo adattabile al mutare delle esigenze. Infatti le placente più piccole, ottenute da cucciolate più numerose, aumentano le prestazioni di scambio per unità di area aumentando la microvascolarizzazione. E' noto dalla letteratura come la densità capillare placentare sia maggiore nelle razze a più alta prolificità come suino ed ovino (Fowden et al., 2009). Alla luce di tali evidenze, nel presente studio si è riscontrato il medesimo adattamento di incremento di densità capillare nelle placente ottenute da cucciolate numerose nel cane. La neoangiogenesi o vasculogenesi adattativa conferma come la placenta sia un organo plastico ed adattabile a modificate esigenze. In medicina umana, la diminuzione dei capillari placentari è stata riscontrata in presenza di età avanzata della madre, nella preclampsia e nel diabete, mentre nel tabagismo attivo e passivo e nell'anemia materna è stato evidenziato un incremento del numero di capillari (Zigic et al., 2010; Rath et al., 2011; Sankar et al., 2013).

Nella casistica selezionata, l'età media materna era di $4,4 \pm 2,1$ anni, e le cagne presentavano un quadro clinico nei limiti della norma, dunque la densità microvascolare placentare non dovrebbe essere influenzata dai fattori sopra riportati. Si conclude che la densità microvascolare non ha avuto influenza sull'outcome del cucciolo, ma è però influenzata dalla numerosità della cucciolata, pertanto andrebbe valutata alla luce di questo parametro. L'infarto placentare, se lobulare, non può avere ripercussioni sul feto, grazie all'efficienza degli scambi a livello del parenchima placentare residuo; la parte sana della placenta è infatti in grado di svolgere una funzione di compensazione (Prakash Telegu e Green, 2008). Nel presente studio, l'infarto placentare multilobulare era significativamente più frequente nei gruppi 2 e 3. Di conseguenza, l'estensione della lesione può aver influenzato l'esito della gravidanza. L'aumento del numero di leucociti intravascolari non sembra essere una lesione primaria, ma molto probabilmente è indotta da cambiamenti degenerativi necrotici.

BIBLIOGRAFIA

-**Abitbol MM**, Pirani CL, Ober WB, Driscoll SG, Cohen MW. (1976) Production of experimental toxemia in the pregnant dog. *Obstet Gynecol.*;48(5): 537-48.

-**Amoroso EC**. (1952). "Placentation", in "Marshall's Physiology of Reproduction", vol2, chapter 15 .

-**Andersen, A. C.** (1957). Puppy production to the weaning age. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 130, 151 - 158.

-**Aralla M.**, Groppetti D., Calderini D., Cremonesi F., Arrighi S. (2013): "Morphological evaluation of the placenta and fetal membranes during canine pregnancy from early implantation to term", *Research in Veterinary Science*, 95:15-22.

-**Aralla M.**, Mobasher A., Groppetti D., Cremonesi F., Arrighi S. (2012): "Expression of aquaporin water channels in canine fetal adenexa in respect to the regulation of amniotic fluid production and absorption", *Placenta* 33:502-510.

-**Arant BS Jr**, Gooch WM. (1979): Effects of acute hyperglycemia on brains of neonatal puppies. *Pediatr Res* 13(abstr), 488.

-**Asan E.**, Kaymaz FF., Cakar AN., Degdeviren A., Beksac MS.(1999): "Vasculogenesis in early human placental villi: an ultrastructure study", *Annals of Anatomy*, 181:549-554.

-**Ashwell M**, Stirling D, Freeman S, Holloway BR. (1987): Immunological, histological, and biochemical assessment of brown adipose tissue activity in neonatal, control, and beta-stimulant-treated adult dogs. *Int J Obes* 11, 357–365.

- Atkins CE.** (1984): Disorders of glucose homeostasis in neonatal and juvenile dogs: Hypoglycemia – Part I. *Comp Cont Educ Pract Vet* 6, 197–208.
- Baergen RN.** (2005) Chapter 18 “Placental Malperfusion” In *Manual of Benirschke and Kaufmann’s Pathology of the Human Placenta* Springer Science+Business Media, Inc.
- Baird, D.** and Thomson A. M. (1969). General factors underlying perinatal mortality rates. In: *Perinatal Problems. The Second Report of the British Perinatal Mortality Survey.* Butler N. R. and Alberman, E. D. (Ed.) E & S Livingstone Ltd. London, 16 - 35.
- Bardens JW.** (1966): Glycogen storage disease in puppies. *Vet Med Small Anim Clin* 61, 1174.
- Barone R.** (2003): “Feto e i suoi annessi”, in “Anatomia comparata degli animali domestici”, Vol.4 “Splanchnologia, apparecchio urogenitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale”, Edagricole, Bologna.
- Beccaglia M.,** Faustini M., Luvoni GC. (2008): “ Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus”, *Reproduction in Domestic Animals*, 43:367-370.
- Beccaglia M.,** Luvoni GC. (2006): “Comparison of the accuracy of two ultrasonographic measurements in predicting the parturition data in the bitch”, *Journal of SAP*, 41:670-673.
- Beck L,** D'Amore PA.(1997): “vascular development: cellular and molecular regulation”, *The FASEB Journal*, 11: 365-373.
- Benirschke K.,** Kaufmann P., Baergen RN. (2006a): “Anatomy and Pathology of the Umbilical Cord” in “Pathology of the human placenta” Fifth edition. Pp: 381.
- Benirschke K.,** Kaufmann P., Baergen RN. (2006c): “ Basic Structure of the Villous Trees”, in “Pathology of the human placenta”, Fifth edition, pp: 93-96.

- Bergstrom, A.;** Fransson, B.; Lagerstedt, A. S. and Olsson, K. (2006). Primary uterine inertia in 27 bitches: Etiology and treatment. *J. Small. Anim. Pract.*, 47:456-460.
- Bjorkman N.,** Dantzer V., Leiser R. (1989): “Comparative placentation in laboratory animals. A review”, *Animal Science*, 16:129 158.
- Blunden, A.S.** (1986). A review of the fading puppy syndrome (also known as fading puppy complex). *Veterinary Annual*, 26, 264 - 269.
- Blunden, A. S.** (1998). The neonate: Congenital defects and fading puppies. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, Simpson, G. M., England, G. C. W. and Harvey, M. (Ed.). British Small Animal Veterinary Association, 143 - 152.
- Boothe DM,** Tannert K. (1992): Special considerations for drug and fluid therapy in the pediatric patient. *Comp Cont Educ* 14, 313–329.
- Bright, J. M.** and Holmberg, D. L. (1990). The cardiovascular system. In: *Veterinary Pediatrics*, Hoskins, J. D. (Ed.) W. B. Saunders Co, Philadelphia, 249 - 269.
- Burd IL.,** Douglas Jones M., Simmons AM. (1975): “Placental production and foetal utilisation of lactate and pyruvate”, *Nature*, 254:710-711.
- Center SA,** Hornbuckle WE, Hoskins JD. (1995): The liver and pancreas. In: Hoskins JD (ed.) *Veterinary Pediatrics: Dogs and Cats from Birth to Six Months*. 2nd edn. Philadelphia: WB Saunders, pp. 189–225.
- Chandler, M. L.** (1990). Canine neonatal mortality. *Society for Theriogenology. Proceedings of the Annual Meeting*, 234 – 253.
- Chastain CB.** (2001): The metabolic system. In: Hoskins JD (ed.). *Veterinary Pediatrics: Dogs and Cats from Birth to Six Months*. WB Saunders, Philadelphia, pp. 300–319; 359–370.

- Cohen RD.**, Woods HF. (1976): “Clinical and Biochemical aspects of lactic acidosis”, first edition, Osney Meade, Oxford, UK Blackwell Scientific.
- Coulter DM.** (1985): Treatment to prevent postnatal loss of brain water reduces the risk of intracranial haemorrhage in the beagle puppy. *Pediatr Res* 19, 1322–1326.
- Crawford MA.** (1995): The urinary system. In: Hoskins JD (ed.) *Veterinary Pediatrics: Dogs and Cats from Birth to Six*.
- Crighton GW.** (1969): Thermal regulation in the newborn dog. *Mod Vet Pract* 50, 35–46.
- Dantzer V.** (2003): “Endotheliochorial Placentation” in Knobil E., Neill DJ.: “encyclopedia of the reproduction”, Vol 1, Accademic Press, San Diego.
- Dantzer VR.**, Leiser R., Kaufmann P., Luckhardt M. (1988): “Comparative morphology aspect of placental vascularization”, *Trophoblast Research*, 3:235-260.
- Darvelied AW.**, Linde-Forsberg C. (1994): “Dystocia in the bitch: a retrospective study of 182 cases”, *Journal of Small Animal Practice*, 35:402-407.
- Davidson AP.** (2006): Clinical assistance of the neonate. 5th annual congress of EVSSAR, Budapest, Proc: pp. 100–105.
- Davidson, A.P.** (2012). Obstetrical emergencies In: *Proceedings of the European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen, Amsterdam*, pp: 170-182 .
- Davidson A.** (2001): “Uterine and fetal monitoring in the bitch”, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31 (2):305-313.
- Demir R.**, Kaufmann P., Castellucci M., Erben R., Kotowski A.(1989): “Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi”, *Acta Anatomica*, 136:190–203.

- Dyce KM**, Sack WO, Wensing CJ. (2010): “Textbook of veterinary anatomy”, Elsevier, Fourth edition, pp 213.
- Doebeli, A.**; Michela, E.; Bettschart, R.; Hartnackc, S. and Reichler, I.M. (2013). Apgar score after induction of anesthesia for canine cesarean section with alfaxalone versus propofol. *Theriogenology*, 80 (8): 850-854.
- **Dor Y.**, Keshet E.(1997): “Ischemia-driven angiogenesis”, *Cardiovascular Medicine*, 7:289-294.
- Dubey JP**, Rosypal AC, Pierce V, Scheinberg SN, Lindsay DS. (2005) Placentitis associated with leishmaniasis in a dog. *J Am Vet Med Assoc*; 227 (8):1266-9.
- Engelstad JS**. (1982): Supportive treatment for diseases of neonatal puppies. *Vet Med Small Anim Clin* 08, 1215–1217.
- England GCW.**, Allen WE. (1990): “Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: diagnosis of early pregnancy and the number of conceptuses”, *Journal of Small Animal Practice*, 31: 321-323.
- Faber JJ.**, Thornburg KL. (1983): “Placental physiology. Structure and function of fetomaternal exchange”, Raven Press, New York, 1983.
- Farquhar, J. W.**, Clairgauh, A. E. , Roberts, F. H., and Schutt, W. H. (1974). The abnormal newborn child. In: *A Companion to Medical Studies*. Vol 3: Passmore, R. and Robson, J. S. (Ed) Blackwell Scientific Publications, Oxford, 45.1 - 5.32.
- Farstad W**. (2003): Infectious diseases of the neonate – a review. 2nd course Reproduction in companion, exotic and laboratory animals. Hannover 2003, proc, pp. 20.1–20.7.

- Fellows EJ.**, Hazzard TM., Kutzler MA. (2012): “Gene Expression in Pre-term, Pre- labour and Parturient canine placenta”, *Reproduction of Domestic Animals*, 47 (suppl.6):182-185.
- Firth JA**, Bauman K., Sibley CP. (1988): “Permeability pathways in fetal placental capillaries”, *Trophoblast Research*, 3:163–177.
- Firth JA**, Leach L. (1996): “Not trophoblast alone: A review of the contribution of the fetal microvasculature to transplacental exchange”, *Placenta*, 17:89–96.
- Fisher EW.** (1982): Neonatal diseases of dogs and cats. *Br Vet J* 138, 277–284.
- Foote AK**, Ricketts SW, Whitwell KE. (2012) A racing start in life? The hurdles of equine fetoplacental pathology. *Equine Vet J Suppl.*; (41):120-9.
- Flood PF.**(1993): “The development of the conceptus and its relationship to the uterus” in Cupps PT: “Reproduction in domestic animals”, fourth edition, Accademic Press INC.
- Forsberg CL.** (2013):“Diagnosi di gravidanza, gravidanza e parto fisiologico nella cagna”, in England GCW., von Heimendahl A., “Riproduzione e neonatologia del cane e del gatto”, seconda edizione, pp 89-97, EV Edizioni Veterinarie, Cremona.
- Foster A.** (2013) Chapter 18: female reproductive system and mammary gland *Pathologic Basis of Veterinary Disease* Di James F. Zachary, M. Donald McGavin.
- Fowden AL**, Sferruzzi-Perri AN, Coan PM, Constancia M, Burton GJ. (2009) Placental efficiency and adaptation: endocrine regulation. *J Physiol* 15; 587(Pt 14): 3459-72.
- Fox, M. W.** (1963). The clinical behavior of the neonatal dog. *Journal of the American Veterinarian Medical Association*, 143, 1331 - 1335.
- Fox, M. W.** (1965). The pathophysiology of neonatal mortality in the dog. *Journal of Small Animal Practice*, 6, 243 – 254.

- Furukawa S**, Kuroda Y, Sugiyama A. (2014) A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *J Toxicol Pathol.*; 27(1): 11-8.
- Fukuda S**, Matsuoka O. (1979) The measurement of the placenta, umbilical cord and components of amniotic fluid in beagle dogs. *Jikken Dobutsu*;28(1):69-73.
- Gaudet, A. D.** (1985). Retrospective study of 128 cases of canine dystocia. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 21: 813-818.
- Gauthier PM.**, Szerlip HM. (2002): “Metabolic acidosis in the intensive care unit”, *Critical Care Clinics*, 18:1-201.
- G.Maffeo-A.Galli** , (1998): La riproduzione, in : G. Aguggino, V. Beghelli, M.G. Clement, A. D’Angelo, A. Debenedetti, C. Facello, L.F. Giulio, R. Guglielmino, A. Lucaroni, G. Maffeo, A. Marongiu, S. Naitana, P. Nuvoli, R. Piazza. “Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia”,pp 769-804, Torino .
- Grether BM.**, Friess AE., Stoffel MH. (1998): “The glandular chambers of the placenta of the bitch in the second third of pregnancy (30-44 day): an ultrastructural, ultrahistochemical and lectin histochemical investigation”, *Anatomia Histologia. Embryologia*, 27:95-103.
- Groppetti D**, Pecile A, Del Carro AP, Copley K, Minero M, Cremonesi F. (2010): Evaluation of newborn canine viability by means of umbilical vein lactate measurement, apgar score and uterine tocodynamometry. *Theriogenology* 74, 1187–1196.
- Gundy SA.** (2006): “Clinical relevant physiology of the neonate”, *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 36(3):443-459.
- Gunn-Moore D.** (2006a): Techniques for neonatal resuscitation and critical care. *WSAVA/FECAVA World Congress 2006, Prague, Proc*, pp. 707–713.

-Gunn-Moore D. (2006b): Small animal neonatology: they look normal when they are born and then they die. WSAVA/FECAVA World Congress 2006, Prague, Proc, pp. 714–720.

-Gyuranecz M, Szeredi L, Rónai Z, Dénes B, Dencso L, Dán Á, Pálmai N, Hauser Z, Lami E, Makrai L, Erdélyi K, Jánosi S. (2011) Detection of Brucella canis-induced reproductive diseases in a kennel. J Vet Diagn Invest.;23(1):143-7.

-Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA (2010) Chapter 19: Female Reproductive System. Fundamentals of toxicologic pathology. 2ND Ed., Academic Press.

-Hashimoto A, Hirai K, Okada K, Fujimoto Y. (1979) Pathology of the placenta and newborn pups with suspected intrauterine infection of canine herpesvirus. Am J Vet Res.; 40(9): 1236-40.

-Heap RB., Fling APF. (1984): “Pregnancy”, in “Reproduction in mammals”, book 3 hormonal control of reproduction, pp 153-194, Cambridge university press.

- Heinrich D., Aoki A., Metz. J. (1988): “Fetal capillary organization in different types of placenta”, Trophoblast Research. 3:149–162.

-Hernandez,M. J., Vannucci,R. C.,Salcedo, A. (1980). Cerebral blood flow and metabolism during hypoglycemia in newborn dogs. Journal of Neurochemistry, 35, 622 - 628.

-Ilkiw. J. E.; Pascoe. P. J. and Patz. J. D. (1992). Cardiovascular and respiratory effects of propofol administration in hypovolemic dogs. Am. J. Vet. Res., 53: 2323-2327.

-Indrebo, A.; Cathrine, T. and Lars, M. (2007). Canine neonatal mortality in four large breeds. Acta Vet. Scand. Suppl., 49:147-149.

-Jackson, P. G. G. (1995). Handbook of Veterinary Obstetrics. Edn. 1st., Saunders, London, pp: 187-189 .

-Jayakumar, C1., Krishnaswamy, A.2 and Sudha, G. (2015):Effectiveness of obstetrical interventions and quality of labor on neonatal viability in dogs .

-Johnson CA., Casal ML. (2012): “Neonatal Resuscitation: Canine and Felin” in Lopate C., Management of pregnant and neonatal dogs, cats and exotic pets”, Wiley- Blackwell, pp77-92.

-Jones, R. L. (1987). Special considerations for appropriate antimicrobial therapy in neonates. Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice, 17, 577 - 620.

-Kadyrov M., Kosanke G., Kingdom J. Kaufmann P.(1998): “Increased fetoplacental angiogenesis during first trimester in anemic women”, Lancet, 352:1747-1749.

-Kaja Sverdrup Borge, Ragnhild Tønnessen, Ane Nødtvedt, Astrid Indrebø (2011): “Litter size at birth in purebred dogs—A retrospective study of 224 breeds” Theriogenology 75 ,911–919.

-Kliegmann RM, Morton S. (1987): The metabolic response of the canine neonate to twenty-four hours of fasting. Metabolism 36, 521–526.

-Kraus, A. and Schwab, A. (1990). The concentration of ionized and total calcium in the blood of female dogs with uterine inertia. Tierarztl Prax., 18(6):641-643

-Krebs C., Winther H., Dantzer V., Leiser R. (1997): “Vascular interrelationships of near-term mink placenta: light microscopy combined with scanning electron microscopy of corrosion casts”, Microscopy Research and Technique, 38:125- 136.

-Lawler, D. F. (1989). Care and diseases of neonatal puppies and kittens. In : Current Veterinary Therapy X, Kirk,(Ed).W.B. Saunders Co. Philadelphia, 1325 - 1333.

- Lawler DF.** (2008): “Neonatal and pediatric care of the puppy and kitten”, *Theriogenology*, 70:384-392.
- Leach L.,** Eaton BM, Firth JA, Contractor SF. (1989): “Immunogold localisation of endogenous immunoglobulin-G in ultrathin frozen sections of the human placenta”, *Cell and Tissue Research*, 257:603–607.
- Leiser R.,** Enders AC. (1980): “Light and electron microscopic study of the near term paraplacenta of the domestic cat. I. Polar zone and paraplacental junctional areas”, *Acta Anatomica*, 106:293-311.
- Leiser R.** (1982): “Development of the trophoblast in the early carnivore placenta of the cat”, *Bibliotheca Anatomica*, 22:93-107.
- Leiser R.,** Kohler T. (1984): “The blood vessels of the cat girdly placenta. Observations on corrosion casts, scanning electron microscopical and histological studies. II. Fetal vasculature”, *Anatomy and Embryology*, 170:209-216.
- Leiser R.,** Koob B. (1993): “Development and characteristics of placentation in a carnivore, the domestic cat”, *The Journal of Experimental Zoology*, 266:642- 645.
- Leiser R.,** Pfarrer C., Elnaeim M., Dantzer V. (1998): “Feto-maternal anchorage in epitheliochorial and endotheliochorial placental types studied by histology and microvascular corrosion casts”, *Trophoblast Research*, 12:21-39.
- Leiser R.,** Schafer A., Mootz U., Krebs C., Beier HM. (1997): “Implantation as beginning of the placentation process in the rabbit: vascular studies at a suitable model shown by light versus scanning electron microscopy”, in, Motta PM (ed) “Microscopy of reproduction and development: a dynamic approach”, pp 251- 259, Anatomio Delfino, Roma.
- Lewis SH,** Benirschke K. (2007) CHAPTER 43 Placenta. in *Histology for pathologist* 3rd edition by Stacey E. Mills (Editor).

-**Lindahl P.**, Johansson BR., Lev'een P., Besholtz C.(1997): “Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B deficient mice”, *Science*, 277:242-245.

-**Linde - Forsberg, C.** and Eneroth, A. (2000). Abnormalities in pregnancy, parturition and the periparturient period. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Edt. Ettinger, S. J., Feldman, E. C. Edn. 5th ., Saunders, Philadelphia, pp: 1527-1539

-**Lopate C.** (2012): “Assessment of fetal well-being and gestational age in the bitch and queen” in, Lopate C. “Management of pregnant and neonatal dogs, cats and exotic pets”, pp 55-75, Wiley-Blackwell.

- **Lùcio, C. F;** Norman, E. J.; Wolsky, K. J. and Mackay, G. A. (2008). Pregnancy- related diabetes mellitus in two dogs. *N. Z. Vet. J.*, 54(6): 360-364.

-**Lùcio CF,** Silva LCG, Rodrigues JA, Veiga GAL, Vannucchi CI. (2009) Acid–Base Changes in Canine Neonates Following Normal Birth or Dystocia. *Reproduction in Domestic Animals*; 44: 208-210.

-**Luvoni GC.**, Beccaglia M. (2006): “The prediction of parturition date in canine pregnancy”, *Reproduction in Domestic Animals*, 41:27-32.

-**Macintire DK.** (1999): Pediatric intensive care. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 971–985.

-**Majolino G.** (2010): “La gravidanza”, in: Farabolini M., Majolino G., Spallarossa M., Zambelli D. “Manuale di ostetricia e neonatologia del cane e del gatto”, pp 27- 49, Elsevier, Milano.

-**McGready TA,** Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT(2006): “Forms of implantation and placentation” in “*Veterinary Embryology*”, pp 78-101, Blackwell Publishing, Oxford.

-**Malasinné A.** (1975): “Evolution ultrastructurales du labyrinthe de placenta de chatte”,

Anatomy and Embryology, 146:1-20.

- **Medias NE.** (1986): “Lactic acidosis”, *Kidney International Supplements*, 29:752-774

-**Miettinen EL.** (1981): Effect of maternal canine starvation on fetal and neonatal liver metabolism. *Am J Physiol* 240, E88–E93.

-**Miglino MA.,** Ambrosio CE., Martins D., Wenceslau CV., Pfarrer C., Leiser R. (2006): “The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes”, *Theriogenology*, 66:1699-1702.

-**Mitchell KE.,** Weiss ML., Mitchell BM., Martin P., Davis D., Morales L., Helwgi B., Beerentrauch M., Abou-Easa K., Hildreth T., Troyer D. (2003): “Matrix cell from Wharton's jelly from neurons and glia” *Stem cells*, 21:50-60.

-**Monson WJ.** (1987): Orphan rearing of puppies and kittens. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 17, 567–576.

-**Moon - Massat, P.** and Erb, H. (2002). Perioperative factors associated with puppy vigor after delivery by cesarean section. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 38 (1): 90-96 .

-**Moon,P.F.;**Erb,H.N.;;Ludders,J.W.,Gleed,R.andPascoe,P.J. (2000).Perioperative risk factors for puppies delivered by cesarean section in the United States and Canada. *J. Am. Anim. Hosp.Assoc.*, 36 (4): 359-368 .

-**Moon PF,** Massat BJ, Pascoe PJ. (2001): Neonatal critical care. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 31, 343–368.

-**Mosier JE.** (1981). Canine pediatrics-The neonate. *Proc. 48th AAHA Ann Meeting:* pp. 339–347.

- Mosier JE.** (1978): The puppy from birth to 6 weeks. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 8, 79–100. Fox MW, 1966: *Canine Pediatrics*. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
- Mott JC.** (1961): The ability of young mammals to withstand total oxygen lack. *Br Med Bull* 17, 2.
- Münnich A, Küchenmeister U.** (2009): Dystocia in numbers: evidence-based parameters for intervention in dogs: causes for dystocia and treatment recommendations. *Reprod Domest Anim* 44(Suppl 2), 141–147.
- Münnich A.** (2008): The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult. *Vet Res Commun* 32 (Suppl 1), S81–S85.
- **Nielen AL, van der Gaag I, Knol BW, Schukken YH.** (1998): Investigation of mortality and pathological changes in a 14-month birth cohort of boxer puppies. *Vet Rec* 142, 602–606.
- Noden MD, De Lahunta A.** (1991) : “Membrane extraembrionali e placentazione”, in “Embriologia degli animali domestici. Sviluppo normale e malformazioni congenite”, pp 61-64, Edi ermes, Milano.
- Ogino S, Redline RW.**(2000): “Villus capillary lesions of the placenta: distinctions between chorangioma , chorangiomatosis and chorangiosis”, *Human Pathology*, 31:945-954.
- Okkens AC., Dieleman SJ., Kooistra HS., Bevers MM.** (1997): “Plasma concentrations of prolactin in overtly pseudopregnant Afghan hounds and the effect of metergoline”, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 51:295-301.
- Olsson, K.; Bergström, A.; Kindahl, H. and Lagerstedt, A. S.** (2003), Increased plasma concentrations of vasopressin, oxytocin, cortisol, and the prostaglandin F2 alpha metabolite during labour in the dog. *Acta. Physiol. Scand.*, 179: 1-7.
- **Pang SD., Boysen S.** (2007): “Lactate in veterinary clinical care”, *Journal of the American*

Animal Hospital Association, 43:270-279.

-Papich, M. G., and Davis, L. E. (1986). Drug therapy during pregnancy and in the neonate. *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*, 16, 525 - 538.

-Pfarrer C., Winther H., Leiser R. (1999): "The development of the endotheliocorial mink placenta: light microscopy and scanning electron microscopical morphometry of maternal vascular casts". *Anatomy and Embryology*, 199:63-74.

- Prakash Telugu B, Green JA. (2008) Comparative Placentation. In *Comparative Reproductive Biology* (eds H. Schatten and G. M. Constantinescu), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

-Poffenbarger EM, Chandler ML, Ralston SL, Olson PM. (1990): Canine neonatology. Part 1: Physiologic differences between puppies and adults. *Comp Cont Educ Pract Vet* 12, 1601–1609.

-Potkay, S. and Bacher, J. D. (1977). Morbidity and mortality in a closed foxhound breeding colony. *Laboratory Animal Science*, 27, 78 - 84.

- Redline RW (2008). Placental pathology: a systematic approach with clinical correlations. *Placenta* ; 29: S86–s91.

-Redline RW. (2014) Placental pathology: Is it time to get serious? <http://contemporaryobgyn.modernmedicine.com/>

-Regazzi FM. (2011). Lung Morphometric and Function Changes in canine neonates after prenatal corticotherapy. Thesis ; 101p.

-Rath G, Dhuria R, Salhan S, Jain AK. (2011) Morphology and morphometric analysis of stromal capillaries in full term human placental villi of smoking mothers: an electron microscopic study. *Clin Ter.*; 162(4): 301-5.

-Ray JE. (2010) Matador and the Regulation of cyclin E1 in Normal Human Placental Development and Placental Pathology. PhD Thesis Graduate Department of Physiology, University of Toronto .

-Richter J. Götze R. (1994): “La gravidanza normale” in “Ostetricia veterinaria”, terza edizione, pp10-90, Casa Editrice Ambrosiana (C.E.A), Milano.

-Sankar KD, Bhanu PS, Ramalingam K, Kiran S, Ramakrishna BA. (2013) Histomorphological and morphometrical changes of placental terminal villi of normotensive and preeclamptic mothers. *Anat Cell Biol.*;46(4):285-90.

-Silva LCG, Lúcio CF, Veiga GAL, Rodrigues JA, Vannucchi CI. (2009). Neonatal Clinical Evaluation, Blood Gas and Radiographic Assessment After Normal Birth, Vaginal Dystocia or Caesarean Section in Dogs. *Reproduction in Domestic Animals*; 44: 160-163.

-Sipriani TM, Grandi F, Silva LCG, Maiorka PC, Vannucchi CI. (2009). Pulmonary maturation in canine foetus from early pregnancy to parturition. *Reproduction in Domestic Animals* ; 44: 137-140.

-Steiger K., Politt E., Hoefmann T., Meyer-Lindenberg A., Schoon HA., Gunzer- Aper AR. (2006): “Morphology of canine placental sites after induced embryonic or fetal death”, *Theriogenology*, 66:1709-1714.

-Srivastava R, Sanyal S, Das S. (2013) Histological changes in canine placenta during acute brucellosis. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2(8): 139-143.

-Sturgess, K. (1998). Infectious diseases of young puppies and kittens. In: *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, Simpson, G. M., England, G. C. W. and Harvey, M.(Ed.).British Small Animal Veterinary Association, 159- 166.

-Stryler L. (1995): “Oxidative phosphorylation”, in Stryler L.: “Biochemistry” fourth edition, pp 529-558, WH Freeman and Company, New York.

- Sparks JW.**, Hay WW. Jr., Bonds D., Meschia G., Battaglia FC. (1982): “Simultaneous measurements of lactate turnover rate and umbilical lactate uptake in the fetal lamb”, *Journal of Clinical Investigation*, 70:179-192.
- Toal RL.**, Walzer MA., Henry GA. (1986): “Comparison of real-time ultrasound, palpation and radiography in pregnancy detection and litter size determination in the bitch”, *Veterinary Radiology*, 27:102-108.
- Trass AM.**(2008): “Resuscitation of canine and feline neonates”, *Theriogenology*, 70:343-348.
- Turberville DF**, Bowen FW, Killam AP. (1976): Intracranial hemorrhages in kittens: hypernatremia versus hypoxia. *J Pediatr* 89, 294–297
- Underwood MA.**, Gilbert WM., Sherman MP. (2005) : “Amniotic fluid: not just fetal urine anymore” *Journal of Perinatology*, 25:341-8.
- Van der Weyden GC.**, Tavern MA., Dieleman SJ., Wurth Y., Bevers MM., van Oord HA. (1989): “Physiological aspects of pregnancy and parturition in dogs”, *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 39:211-224.
- Veggetti A.** (1982): “Gli Annessi Embrionali” in “Corso di embriologia”, seconda edizione, pag 61-101, Società editrice esculapio, Bologna.
- Veronesi MC.** (2013): “Neonatologia del cane e del gatto” in: Veronesi MC., Castagnetti C., Taverne MAM., “Neonatologia veterinaria”, pp 4-88, Edises, Napoli.
- Veronesi MC.**, Panzani S., Faustini M., Rota A. (2009): “An Apgar scoring system for routine assessment of newborn puppy viability and short-term survival prognosis”, *Theriogenology*, 72:401-407.
- Vibha, R. K.** (2012). Medical management of primary uterine inertia in female dogs. M.V.Sc. thesis, Karnataka Veterinary, Animal and Fisheries Sciences University, Bidar.

-**Wynn RM.**, Corbett JR. (1969): “Ultrastructure of the canine placenta and amnion”, American Journal of Obstetrics & Gynecology, 103,878-887.

-**Young RSK**, Yagel SK, Towfighi J. (1983): Systemic and neuropathologic effects of E. coli endotoxin in neonatal dogs. Pediatr Res 17, 349–353.

-**Zigić Z**, Marković S, Grbesa D, Ramić S, Halilović A. (2010) Quantitative research of capillaries in terminal villi of mature placentae. Bosn J Basic Med Sci.; 10(2): 147-52.

-**Zone MA**, Wanke MM. (2001): Diagnosis of canine fetal health by ultrasonography. J Reprod Fertil Suppl 57, 215–219.

