



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**  
**CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN**  
**SCIENZE VETERINARIE**

*INDIRIZZO:* Riproduzione, Produzione e Benessere Animale **(XXIX CICLO)**

**Applicazioni tecnico metodologiche per il  
miglioramento della performance riproduttiva nel  
cane di allevamento**

**Methodology and technical applications for the  
improvement of the reproductive efficiency in  
breeding dogs**

**Docente Guida**  
**Prof. Sergio Ledda**

**Il Coordinatore**  
**Prof. Salvatore Naitana**

**Tesi di dottorato della**  
**Dott.ssa Giovanna Maria Bassu**

**ANNO ACCADEMICO 2015 - 2016**

## Ringraziamenti – Remerciements

Molte persone mi hanno aiutato durante questi anni e hanno partecipato alla realizzazione di questo lavoro, vorrei ringraziare tutti per avermi sostenuto e aiutato.

In particolare,  
al Prof. **Sergio Ledda**, per la sua infinita pazienza e per avermi dato l'occasione di poter effettuare questa tesi

ai miei due referees:

**Marco Russo**, uno degli uomini più simpatici del mondo e

**Stefan Deleuze** cher ami depuis toujours,

per aver accettato di correggere la tesi, per il tempo che avete speso per me anche se siete occupatissimi.

Grazie di avermi sostenuta ed aiutata e soprattutto di aver avuto fiducia in me, spero di non avervi deluso

ai **miei genitori** per tutto quello che hanno fatto e continuano a fare per me e i miei folli progetti. Un particolare “grazie” alla mia mamma, la mia traduttrice “google” privata

a **Alessandro Strina**: non potro' mai ringraziati abbastanza. Dai ritorna in Belgio! Ci manchi

a **Claudia Guantini**, che si é messa allo studio della riproduzione canina all'unico scopo di aiutarmi. Grazie cuginetta bellissima e bravissima

aux **Dr. Francis Corazza** et **Charles Gerard** pour l' aide précieuse.

a **Emmanuel Schneider** pour ses precieuses statistiques et a **Anne Dytrych** pour ... tout

a **Alain Fontbonne**, pour m'avoir formée à cette discipline qui est la reproduction des petits animaux

a ma « famille belge » : **Dimitri Spinoit**, **Marc Harms**, **Federica Floris** et **Nathalie Hansen** , pour votre soutien sans faille, et votre réconfort

**A tous les éleveurs qui ont participé de près ou de loin à cette étude.**

Mais aussi à tous mes clients.

Merci pour la confiance que vous m'accordez.

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>p. 4</b>
<b>PARTE GENERALE</b>	<b>p. 9</b>
<b>1. Scopi ed indicazioni della riproduzione assistita nel cane</b>	<b>p. 9</b>
<b>2. Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore della femmina</b>	<b>p. 11</b>
<b>2.1. L'anatomia</b>	<b>p. 11</b>
<b>2.1.1. Ovaio</b>	<b>p. 11</b>
<b>2.1.2. Tube Uterine</b>	<b>p. 12</b>
<b>2.1.3. Utero</b>	<b>p. 12</b>
<b>2.1.4. Vagina</b>	<b>p. 13</b>
<b>2.1.5. Vulva e clitoride</b>	<b>p. 13</b>
<b>2.2. La fisiologia</b>	<b>p. 14</b>
<b>2.2.1. La pubertà</b>	<b>p. 14</b>
<b>2.2.2. Il ciclo estrale</b>	<b>p. 15</b>
<b>2.2.2.1. Il proestro</b>	<b>p. 16</b>
<b>2.2.2.2. L'estro</b>	<b>p. 17</b>
<b>2.2.2.3. Il metaestro e il diestro</b>	<b>p. 17</b>
<b>2.2.2.4. L'anestro</b>	<b>p. 18</b>
<b>3. Momento ottimale di fecondazione</b>	<b>p. 19</b>
<b>4. Monitoraggio del calore</b>	<b>p. 20</b>
<b>4.1. Probabilità di successo di una fecondazione in base alla metodica di monitoraggio utilizzata</b>	<b>p. 20</b>
<b>4.2. Monitoraggio dei calori attraverso la colpocitologia, la progesteronemia e la vaginoscopia</b>	<b>p. 21</b>
<b>4.2.1. La colpocitologia</b>	<b>p. 21</b>
<b>4.2.2. Il dosaggio del progesterone</b>	<b>p. 27</b>
<b>4.2.3. La vaginoscopia</b>	<b>p. 28</b>
<b>5. Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore del maschio</b>	<b>p. 30</b>
<b>6. Raccolta del materiale seminale e valutazione del seme</b>	<b>p. 31</b>
<b>7. Tecniche di inseminazione artificiale e fattori che incidono sulla fertilità e sull'efficienza delle diverse tecniche di riproduzione assistita</b>	<b>p. 35</b>
<b>7.1. L'Inseminazione intravaginale</b>	<b>p. 38</b>
<b>7.2. L'inseminazione intrauterina</b>	<b>p. 38</b>
<b>7.3. La gestazione</b>	<b>p. 40</b>
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<b>p. 45</b>
<b>1. MATERIALS AND METHODS</b>	<b>p. 46</b>
<b>2. STATISTICAL ANALYSIS</b>	<b>p. 50</b>
<b>3. RESULTS</b>	<b>p. 50</b>
<b>4. DISCUSSION</b>	<b>p. 72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>p. 78</b>

## INTRODUZIONE

Il progetto sviluppato in questa tesi riguarda lo studio dell'allevamento cinofilo dal punto di vista socio-economico, tramite l'utilizzazione di diverse tecniche di riproduzione assistita miranti al miglioramento della performance riproduttiva nell'allevamento del cane di razza.

La riproduzione dei cani di razza, operando all'interno di un complesso sistema economico che circonda il mondo cinofilo, può essere analizzata sotto molteplici punti di vista, dove raramente il risultato corrisponde alle aspettative.

Difatti, l'allevamento cinofilo non richiede un notevole investimento di capitali, tuttavia i costi di mantenimento e le spese annesse al mondo del cane di razza sono comunque elevati.

Per questo motivo una valutazione puramente economica dell'allevamento cinofilo, non è facile impresa. L'allevatore pone l'accento prevalentemente, non sulla *performance* in termini di efficienza produttiva, ma si basa su parametri difficilmente contabilizzabili. In questo ambito ci si trova a considerare delle variabili, quali la conformazione estetica del cane, l'attitudine ad un particolare tipo di sport o lavoro, mentre i principi di minimizzazione dei costi e massimizzazione dei ricavi passano spesso in secondo piano.

Invero, è interessante rilevare come la cinofilia abbia subito importanti mutamenti soprattutto negli ultimi decenni. Nella prima metà degli anni '90 questo tipo di attività, perlopiù, era affidata ad allevatori di vecchio stampo che avevano un approccio empirico: imparavano dai loro sforzi e dai loro errori, ma si documentavano poco, sviluppando in misura marginale le conoscenze tecniche. La cinotecnica, infatti, non era considerata come materia di studio, ma come una forma di allevamento più amatoriale che redditizia. Quando alcuni allevatori cominciarono ad applicare i principi di genetica, lo studio tecnico delle linee di sangue e una maggior cura nella scelta degli esemplari da

riproduzione, la cinofilia iniziò ad assumere un aspetto diverso. Non era più esclusivamente “esperienza”, ma si preparava a diventare “scienza”. Se questi allevatori riuscirono a tramutare rapidamente l’approccio a questo settore, si può certamente ritenere che abbiano ottenuto dei successi grazie ai loro sistemi di selezione. Ciò in quanto in ambito cinofilo, proprio come in tutte le scienze, sono coinvolte più materie, l’una imprescindibile dall’altra. L’aver delle buone basi di cinognostica, ma scarse conoscenze di genetica sarà del tutto inutile: come è possibile capire, in questi casi, se un buon cane tramanderà i propri pregi alla prole? Intraprendere un’attività di allevamento senza una buona preparazione tecnica, non può che scoraggiare il neofita. È impossibile produrre ottimi cani senza possedere i mezzi adeguati per comprendere, e rendere efficace, ciò che si sta portando avanti. Dunque, il neocinofilo dovrà essere consapevole del fatto, che la sua decisione non comporta il solo contatto diretto con i cani, ma si renderà imprescindibile uno studio approfondito di tutte le branche della materia cinotecnica.

Per ciò che concerne gli aspetti economici è opportuno catalogare le diverse tipologie allevatori in base al ciclo economico dell’allevamento. Si possono distinguere tre diversi tipi di gestione, ognuna delle quali caratterizzate da differenti obiettivi. La prima categoria è quella dell’allevamento in relazione alla qualità della produzione. È fondamentale comprendere che i riscontri economici sono difficilmente proporzionati all’impegno nell’allevamento. Si potrebbe esser portati a ritenere che sia garantito un certo ritorno economico, ma il più delle volte la realtà non è questa. L’allevatore dovrà tener conto del fatto che il ciclo economico sarà pressoché in perdita in maniera costante. Questo non accade per una errata strategia di impresa, piuttosto dipende dal fatto che il cane, non essendo una fonte di beni di consumo, è soggetto alle tendenze di un pubblico sempre più esigente e, purtroppo, spesso troppo fazioso. Il neofita, potrà

essere facilmente tratto in inganno dal prezzo dei cuccioli prodotti in allevamento o dalle cifre contenute di un qualche stallone importato. Con ciò si intende che il ritorno economico non è un dato certo. Il possibile guadagno non deve essere ciò che spinge ad intraprendere tale attività in quanto sono rari i casi in cui si possa vivere grazie al solo allevamento. La seconda categoria è quella dell'allevamento in relazione ad un budget prestabilito. Si tratta del tipo di allevamento più diffuso e tipico all'allevatore medio. L'intenzione di sfruttare esclusivamente un certo capitale, è quasi sicuramente un'impresa destinata a fallire. La causa dell'insuccesso dipende dagli imprevisti di produzione, difficilmente calcolabili o spesso non tenuti debitamente in conto. È indispensabile prefiggersi un limite finanziario quando si tratta di un allevamento canino. Nelle aziende zootecniche, destinate alla produzione di latte o carne, la maggior parte degli imprevisti di produzione si risolvono con l'abbattimento o la macellazione dei capi. Il cinofilo, invece, sarà obbligato ad adottare differenti soluzioni il più velocemente possibile: questo comporterà un ulteriore dispendio economico. La terza categoria è quella in cui si collocano gli allevamenti in relazione alla risposta economica. Questo è sicuramente il peggior sistema di allevamento poiché coloro che puntano sul mero riscontro economico, non solo recano un danno alla razza della quale si occupano, ma screditano anche il lavoro degli allevatori qualificati. La cinofilia difficilmente può rappresentare una fonte di guadagno, ed è per questo che è sempre meglio diffidare da chi si arricchisce attraverso il commercio di animali domestici. Per godere dei profitti si devono limitare gli investimenti economici con la conseguenza che si introdurranno nell'allevamento animali di scarsa qualità, verranno adottati sistemi di produzione superficiali o scadenti evitando ogni forma di miglioramento genetico. La richiesta di cuccioli aumenterà indubbiamente, grazie alle cucciolate più frequenti e prezzi

conseguentemente più bassi; a discapito dei cani, degli allevatori specializzati e degli acquirenti inconsapevoli.

In tale contesto è inoltre doveroso tenere in considerazione il *trend* del mercato.

Le razze di piccola taglia diventano sempre più popolari, mentre quelle di taglia medio grande lo sono sempre meno ; la dimensione media di un cane, misurata dalla circonferenza del collo, ha avuto un netto decremento. Gli standard di vita possono essere ritenuti come i responsabili di tale mutamento. La crisi che dal 2008 ha investito e che tutt'ora investe il vecchio continente è certamente una delle cause che hanno determinato tale inversione di tendenza. Non c'è da meravigliarsi, quindi, che le persone siano alla ricerca di animali decisamente più economici sia dal punto di vista del mantenimento, sia da quello delle cure veterinarie. Infatti, nutrire un cane di piccola taglia piuttosto che un cane dalle grandi dimensioni non può che avere un peso decisamente inferiore sulla spesa mensile di una famiglia.

Oltre a ciò, gli abitanti delle città sono incoraggiati ad optare per i cani di piccola taglia. Incidono indubbiamente le questioni legate alla vita all'interno di un condominio e all'abbandono dell'abitazione singola come principale tipologia di struttura abitativa. Ma vi è un'altra ragione. Le case sono più piccole, le camere e i giardini, quando presenti, sono di ridotte dimensioni, non certo idonei ad ospitare un cane di taglia grossa. Invece, tali piccole dimensioni ben si adattano alle dimensioni dei cani toy. La conferma di questa variazione può essere riscontrata analizzando i dati. In Europa, ad esempio, è emerso che si stia optando per la versione ridotta del "pet" prescelto. Infatti, il numero dei bassotti standard è diminuito del 2,5%, mentre il numero di bassotti nani è aumentato di 1/3.

La moda è un altro fondamentale elemento dal quale un allevatore odierno non può più prescindere. Prendiamo ad esempio lo Skye Terrier, uno dei più antichi terrier del mondo, con un lignaggio che risale al medioevo.

A quei tempi era un cane molto popolare tanto che la regina Vittoria fece diventare questa razza di tendenza. Si racconta, invece, che Maria Stuarda ne avesse uno nascosto sotto la gonna il giorno della sua esecuzione. Questa razza, prima tanto popolare e nota, oggi è a rischio di estinzione. Gli allevatori di Skye Terrier stanno facendo del loro meglio, ma i risultati non sono ottimali. Nel mondo si contano circa 3.500 e 4.000 esemplari, tanto da essere una delle più rare al mondo, perfino più rara del panda rosso. Ci si chiede come ciò sia potuto accadere.

La storia insegna che l'evoluzione delle razze canine siano andate di pari passo con l'evoluzione umana ed abbiano avuto l'importante funzione di riempire i diversi ruoli funzionali. Al mutare della società mutava anche la funzione del cane, sì da portare all'estinzione della razza tutte le volte in cui la funzione svolta da quella particolare razza non si fosse rivelata utile e necessaria. Le forze che oggi governano l'economia cinofila sono particolari. Viviamo in un'epoca in cui la razza canina ha un valore post funzionale, dove una razza potrebbe ipoteticamente sopravvivere all'estinzione umana, ma non avrebbe scampo qualora sfortunatamente dovesse diventare fuori moda.

## **PARTE GENERALE**

### **1. Scopi ed indicazioni della riproduzione assistita nel cane**

Nel cane, la riproduzione assistita è impiegata principalmente per motivi sanitari e allo scopo di ottenere una progenie più numerosa da animali geneticamente superiori e da soggetti con fertilità ridotta. Essa può infatti consentire l'utilizzo di maschi e femmine che non sarebbero in grado di riprodursi in maniera naturale, per delle ragioni anatomiche, patologiche (es. malformazioni del pene, malformazioni congenite o acquisite della vagina che impediscono la penetrazione, patologie muscolo scheletriche, ecc.) o legata a dei motivi comportamentali. Inoltre, l'interesse di diluire lo stesso eiaculato per fecondare più femmine, la possibilità di esaminare preventivamente il seme e ridurre il contatto fisico tra i riproduttori prevenendo, soprattutto per quel che riguarda il maschio, le eventuali malattie contagiose ne fanno un utile strumento per gli allevatori.

A questo scopo sono state sviluppate e perfezionate varie tecniche di riproduzione assistita. Nel cane, le principali utilizzate sono l'inseminazione artificiale e la crioconservazione degli spermatozoi. Le tecniche di riproduzione assistita negli animali domestici hanno avuto, negli ultimi decenni, un notevole sviluppo. Tuttavia, il livello di efficienza di alcune di queste tecnologie presenta ampie variabilità in relazione alla specie animale presa in considerazione in particolare nel cane, dove la maturazione in vitro rappresenta un grosso limite allo sviluppo di tutte le altre biotecnologie.

Infatti, se si considera che nel cane la prima inseminazione artificiale fu effettuata da Spallanzani nel 1780, che la prima descrizione di un oocita di mammifero fu effettuata su un oocita di cane nel 1827, che nel 1956 nasce la prima cucciolata proveniente da IA con seme refrigerato e nel 1969 la prima cucciolata nata da IA con seme congelato, le

biotecnologie riproduttive nel cane sono rimaste considerevolmente indietro rispetto agli altri animali domestici.

I primi esperimenti di ET di embrioni derivati in vivo hanno avuto scarse percentuali di successo (Kinney et al., 1979; Kraemer et al., 1979; Tsutsui et al., 1989; Tsutsui et al., 2001b). Solo il trasferimento intratubarico di embrioni a stadi precoci prodotti in vivo ha portato a gravidanza (Tsutsui et al., 2001a); e nel 2006 anche il trasferimento intrauterino di embrioni precoci prodotti in vivo ha avuto successo (Tsutsui et al.). Tuttavia i risultati variabili nella sincronizzazione dell'estro tra donatrice e ricevente ed infine la necessità di impiegare tecniche chirurgiche per il recupero ed il trasferimento degli embrioni ne limitano l'utilità.

Per quanto riguarda il trasferimento di embrioni prodotti in vitro, la prima gravidanza fu ottenuta nel 2001 da England et al., purtroppo la gravidanza non è stata portata a termine. Nel 2005, il trasferimento di embrioni clonati è risultato nella nascita di 2 cuccioli (Lee et al.). L'efficienza di queste tecnologie è ancora molto limitata, la cui causa è probabilmente imputabile alle particolari caratteristiche degli oociti canini e alla mancanza della loro completa acquisizione della capacità di sviluppo *in vitro*. Nonostante sia possibile maturare oociti di cane *in vitro*, i risultati non sono soddisfacenti (Nickson et al., 1993; Hewitt e England, 1997; Otoi et al., 2000; 2004 e 2006; Saint-Dizier et al., 2001; Songsasen et al., 2002; Rodrigues et al., 2004).

Il congelamento embrionale apporterebbe la possibilità di trasferire gli embrioni conservati in riceventi che siano sincronizzate in maniera naturalmente.

Al contrario, la crioconservazione del seme di cane è stata, oltre che ampiamente studiata negli ultimi decenni, ampiamente utilizzata. Essa infatti, ha reso possibile la commercializzazione a livello internazionale del seme di animali provenienti da tutto il

mondo oltre che l'istituzione di banche di materiale genetico di riproduttori di elevato valore.

L'inseminazione artificiale intrauterina, con seme congelato o con seme di cattiva qualità, comporta una percentuale di gravidanza superiore a quella ottenibile con l'inseminazione intravaginale. A questo scopo, sono state messe a punto svariate tecniche, tra cui l'impiego di un catetere metallico intrauterino (tecnica scandinava) che viene fatto passare attraverso una guida, costituita da un tubo di plastica rigida inserito nel canale vaginale, mentre la cervice viene mantenuta per via transaddominale (Andersen, 1975); oppure la tecnica chiamata TCI, o trans-cervical-insemination che visualizza la cervice mediante endoscopia, utilizzando in questo caso un catetere ureterale flessibile di plastica (Wilson, 1993). La tecnica laparoscopica ed il metodo chirurgico per laparotomia, non essendo considerati etici in molti paesi europei, sono riservati solamente a casi particolari. Ad esempio nel caso del seme di uno stallone morto ma di elevato valore genetico, di cui siano rimasti disponibili solo pochi spermatozoi.

## **2. Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore della femmina**

### **2.1. L'anatomia**

#### **2.1.1. Ovaio**

Le ovaie, situate caudalmente ai reni, sono avvolte da una borsa ovarica più o meno infiltrata di grasso a seconda della razza, dell'età o delle caratteristiche individuali.

Le dimensioni dell'ovaio di cane variano col peso: in generale nelle cagne di media taglia ogni ovaio è lungo 15-20 mm, alto 10-15 mm e spesso 8-10 mm; il suo peso può variare da 1 a 3 g.

Quasi liscio durante l'anaestro diviene irregolare e bozzellato, per la presenza di numerosi follicoli, nel periodo di attività ormonale.

Nel proestro il numero di follicoli che entra in maturazione varia con la razza: 5-8 nelle femmine di piccola taglia e 10-15 in quelle di grande taglia. (Barone, 2009).

La posizione varia col variare del ciclo ormonale. Spesso più attaccato al rene durante l'anaestro, si sposta più lateralmente e posteriormente durante il periodo del calore.

L'ovulazione avviene spontaneamente ad ogni calore, che la cagna abbia o meno contatti con soggetti maschi. I gameti liberati, in numero variabile anche in questo caso a seconda della razza e del soggetto, hanno la particolarità di essere oociti primari, e dunque incapaci di andare incontro a fecondazione prima delle 48 - 72 ore necessarie per la loro maturazione, che avviene con l'espulsione del secondo globulo polare. La fecondazione avviene nelle tube uterine, situate all'interno della borsa ovarica.

### **2.1.2. Tube Uterine**

Ogni tuba uterina è lunga da 6 a 10 cm.

L'infundibulo, a forma di imbuto, si apre medialmente verso l'ovaio, sul margine ventrale dell'orificio della borsa ovarica (Barone R 2009).

### **2.1.3. Utero**

La cagna presenta un utero bipartito. Le corna uterine rappresentano in questa specie la parte più sviluppata dell'utero, cui conferiscono una forma a "v", e sono deputate ad accogliere gli embrioni. La lunghezza è variabile in rapporto alla taglia della cagna ed alla parità. Le corna si uniscono a livello del corpo dell'utero, meno sviluppato, che funge da raccordo con la parte craniale della vagina tramite la cervice o collo dell'utero. Quest'ultimo si presenta come un piccolo cilindro di consistenza cartilaginea, capace di dilatarsi fisiologicamente durante i calori e al parto. Il canale cervicale è fornito di un

piccolo orifizio che consente la risalita degli spermatozoi dopo l'accoppiamento. E' orientato obliquamente in direzione cranio-caudale e dorso-ventrale, di modo che l'ostio esterno dell'utero è rivolto verso il pavimento della vagina. Questa singolare conformazione lo rende difficilmente cateterizzabile e si è reso necessario mettere a punto tecniche particolari (tecnica scandinava e vaginoscopia) per ottenere questo scopo. Nei periodi riposo sessuale il collo dell'utero è duro e rigido e il canale cervicale è completamente chiuso. Soltanto durante l'estro il collo diventa più morbido e il canale si presenta pervio (Barone, 2009).

#### **2.1.4. Vagina**

La vagina della cagna è, in proporzione, più lunga rispetto a quella della maggior parte delle altre specie. La lunghezza varia sensibilmente con la taglia della cagna e con la razza. Presenta nel suo terzo caudale, al confine con la vulva, una direzione pressochè dorso-ventrale, mentre nei due terzi anteriori assume un andamento cranio-caudale.

Accoglie il pene del maschio che deposita il seme caudalmente al collo dell'utero. Alla sua estremità caudale la vagina è dotata di una struttura muscolare anulare che, stringendo la base del pene durante l'accoppiamento, ne mantiene l'erezione. Le contrazioni di questa muscolatura favoriscono la risalita degli spermatozoi.

Sul pavimento dell'organo è presente la fossa clitoridea, più o meno profonda e generalmente visibile divaricando le labbra vulvari, nella quale è alloggiato il clitoride.

#### **2.1.5. Vulva e clitoride**

Le labbra della vulva sono grosse e si uniscono in corrispondenza di una commessura dorsale arrotondata, spesso sormontata da una piega cutanea trasversale. La commessura ventrale è invece appuntita. Il clitoride, normalmente di piccole dimensioni, può svilupparsi considerevolmente a seguito di trattamenti ormonali con androgeni, o ancora in seguito a processi infiammatori cronici o a lambimento costante.

Puo' presentare perfino un "osso clitorideo" in caso di intersessualità. Il meato urinario sbocca in un voluminoso tubercolo uretrale.

## **2.2. La fisiologia**

### **2.2.1. La pubertà**

La cagna presenta una fisiologia riproduttiva di tipo monoestrale stagionale, pur non avendo cicli estrali correlati con la stagione. Tra un calore e l'altro si verifica un periodo di anestro.

La pubertà si manifesta ad un'età che può variare tra i 4 e i 18 mesi, normalmente quando l'animale raggiunge all'incirca l'80% del proprio peso da adulto. Vi è dunque ampia variabilità tra le varie razze e, all'interno di queste, tra i singoli individui.

In generale si può affermare che la pubertà nelle razze piccole o nane si raggiunge entro i 9 mesi, mentre nelle razze grandi o giganti le prime manifestazioni estrali possono verificarsi anche a 15 mesi e oltre.

A questo si aggiunge il fatto che in una percentuale del 20 - 25% dei soggetti il primo calore può svolgersi in maniera atipica, con l'instaurarsi di calori silenti o ripetuti.

Il primo caso si verifica più frequentemente nelle razze nane e soprattutto nei soggetti che vivono separati dai loro consimili. In questi animali le normali manifestazioni estrali sono difficilmente rilevabili e il primo calore passa facilmente inosservato.

Nel secondo caso un ciclo che si presenta con un normale proestro può interrompersi dopo circa una settimana, per poi ripresentarsi dopo 15 giorni/un mese come calore normale o nuovamente come calore "abortito". L'evento può verificarsi per 2 o 3 volte, prima di lasciar posto ad un calore completo. E' opportuno sottolineare come il livello ematico di progesterone si mantenga su livelli basali fino all'instaurarsi del ciclo normale.

Queste "pubertà atipiche" non hanno alcun significato patologico e non compromettono in alcun modo la futura fertilità dei soggetti.

### **2.2.2. Il ciclo estrale**

Il ciclo estrale della cagna si presenta generalmente 2 volte all'anno con intervalli pressapoco regolari. E' divisibile in 4 fasi distinte : il proestro e l'estro rappresentano il periodo del calore, il metaestro e il diestro quello della gestazione, mentre l'anestro è la fase di riposo che separa due periodi sessualmente attivi.

Il proestro e l'estro hanno una durata media di 8 - 10 giorni, con estremi che possono andare dai 3 ai 20 - 30 giorni. Il metaestro/diestro presenta una durata più costante, essendo correlato al periodo della gravidanza, e si svolge in 50 - 55 giorni. La durata dell'anestro può andare dai 3 ai 5 mesi.

Anche in questo caso è presente una notevole variabilità interrazziale e interindividuale. Infatti razze come il Rottweiler e il Pastore Tedesco presentano spesso un ciclo estrale ogni 4 mesi, il Collie e il Labrador ogni 8, il Basenji e il Cane Lupo di Saarloos una volta all'anno.

Variazioni nella frequenza dei calori nei singoli soggetti possono essere facilmente provocate da fattori quali l'età (come visto sopra nel caso dei calori silenti nelle cagne giovani), le relazioni interindividuali o di dominanza, con la possibile insorgenza di calori sincronizzati o inibiti, e i trattamenti farmacologici a base di estrogeni, progestageni, corticoidi, antifungini, abortigeni.

La frequenza nell'insorgenza dei cicli estrali può inoltre subire modifiche dovute a cause patologiche. Tra queste ricordiamo le cisti follicolari e i tumori ovarici, che possono

provocare fenomeni di iperestro o di anestro, l'anovulazione, l'insufficienza luteale, il riassorbimento embrionale o fetale, l'aborto.

### **2.2.2.1. Il proestro**

Il primo segno dell'inizio del calore è normalmente rappresentato da un certo grado di rigonfiamento edematoso delle labbra vulvari e da uno scolo sieroso-emorragico di origine uterina. Questi segni non sono ugualmente appariscenti tra i vari individui. Soprattutto l'entità dello scolo vulvare è assai variabile, fattore, quest'ultimo che può spesso trarre in inganno per quanto riguarda l'esatta durata della fase in oggetto e del successivo estro. Dal punto di vista ovarico e ormonale il proestro rappresenta la fase della maturazione dei follicoli, dalle cui cellule della granulosa sono secreti gli estrogeni. L'aumento della concentrazione sierica di questi ormoni è in effetti la causa dei segni tipici del proestro descritti sopra e dell'attrazione esercitata, grazie alla produzione di feromoni, verso gli esemplari maschi, sebbene ancora la cagna rifiuti l'accoppiamento. La concentrazione degli estrogeni raggiunge quindi un picco (che in 24 - 48 ore induce, per feedback, la produzione di LH dall'ipofisi) per poi cominciare a decrescere ancor prima che la cagna sia disposta all'accoppiamento e attestarsi su valori basali 4 - 5 giorni dopo il picco di LH. La secrezione di LH, a sua volta, aumenta rapidamente fino a raggiungere, entro 1 o 2 giorni, il picco pre-ovulatorio, che determina l'inizio dell'estro e ha una durata media di 24 ore ma può arrivare ad un massimo di 96 ore. Allo stesso tempo il fenomeno della luteinizzazione pre-ovulatoria dei follicoli ha portato questi ultimi a cominciare la produzione di P4, i cui valori raggiungono i 2 - 3 ng/ml al momento del picco di LH.

### **2.2.2.2. L'estro**

In questa fase la cagna presenta normalmente un comportamento agitato e ricerca attivamente l'accoppiamento. Lo scolo vulvare tende a diminuire e assume generalmente un aspetto più chiaro e mucoso, mentre la vulva assume un aspetto più tonico. L'ovulazione si verifica mediamente 48 ore dopo il picco di LH, pressochè in contemporanea tra le due ovaie, ed ha una durata di 12 – 24 ore. Gli oociti liberati con l'ovulazione sono in questa specie degli oociti primari, e per essere fecondabili devono andare incontro ad un processo di maturazione della durata di 48 – 72 ore che li porta a espellere il secondo globulo polare per raggiungere lo stato di oociti secondari. In questo lasso di tempo essi discendono lungo le tube uterine, sito in cui la fecondazione deve avvenire entro 24 – 36 ore, limite oltre il quale vanno incontro a degenerazione. Dopo 8 – 10 giorni l'oocita fecondato giunge nell'utero avendo raggiunto lo stadio di morula o di giovane blastocisti. Sul piano ormonale, l'estro si caratterizza per il rapido aumento della concentrazione del P4, il cui valore ematico al momento dell'ovulazione oscilla tra i 4 e i 10 ng/ml, mentre l'LH si assesta su valori basali.

### **2.2.2.3. Il metaestro e il diestro**

Fin dal primo giorno di questa fase la cagna, che non presenta più alcuno scolo vulvare, non accetta più il maschio e presenta generalmente un atteggiamento più calmo, per poi modificare ancora il proprio comportamento successivamente, in caso di gravidanza o di pseudogravidanza. Indipendentemente dal fatto che ci sia stata fecondazione o meno, questa fase è caratterizzata dal punto di vista ormonale dalla produzione di P4, e dura circa due mesi. E' anche detta fase luteale. L'azione del P4 sull'utero provoca da un lato un'imponente ipertrofia delle ghiandole endometriali, che secernono grandi quantità di muco, mentre dall'altro ne arrestano l'attività contrattile, per favorire l'impianto

dell'embrione. La concentrazione massima dell'ormone (fino a 70 ng/ml) è raggiunta verso la metà del diestro, tra i 15 e i 30 giorni dopo il picco di LH, per poi diminuire bruscamente 24 – 48 ore prima del parto per riattestarsi su valori basali. Se non si è instaurata una gestazione questo calo presenta un andamento più graduale, tra il 51° e l'82° giorno dopo il picco di LH. Aumenta invece la concentrazione della prolattina (intorno al 25° giorno), ormone deputato, tra l'altro, alla permanenza del corpo luteo, e degli estrogeni. Le ghiandole mammarie, il cui sviluppo è stato incrementato dalla lunga esposizione ad alti tassi di P4, cominciano la produzione di latte sotto l'influsso della prolattina, che accresce bruscamente la propria concentrazione tra le 16 e le 56 ore prima del parto. I tassi ematici di LH si mantengono su livelli basali durante il metaestro, per risalire lentamente durante il diestro. Altro ormone tipico di questa fase è la relaxina, prodotta dalla placenta a partire dal 20° giorno di gestazione, che raggiunge il suo picco tra le 2 e le 3 settimane prima del parto e torna a livelli basali quando questo si verifica.

#### **2.2.2.4. L'anestro**

È la fase del riposo sessuale, che separa il diestro dal proestro successivo. La sua durata, mediamente di 5 – 6 mesi, può avere valori estremi che vanno da 1 a 10 mesi. Razze primitive come il Basenji presentano un solo calore all'anno; altre, come il Pastore Tedesco, hanno calori ogni 4 mesi – 4 mesi e ½. I meccanismi che determinano le variazioni nei periodi di anestro sono ancora oggetto di studio e comprendono la stagione, l'alimentazione, l'habitat, oltre a fattori psicologici. Le manifestazioni esterne dell'anestro comprendono una riduzione di volume delle labbra vulvari e la completa involuzione dell'apparato mammario. A livello ovarico si compie in questo periodo la degenerazione dei corpi lutei, mentre l'utero va incontro ad una involuzione che ne

riduce sensibilmente il volume. Questo stato di quiescenza deve avere una durata minima di 2 mesi, affinché l'organo sia in grado, al ciclo successivo, di accogliere l'impianto embrionario e sostenere la gestazione. Nell'ultimo periodo dell'anestro, circa un mese prima del successivo proestro, l'LH mostra una ripresa dell'attività pulsatile con dei piccoli picchi di concentrazione ematica.

### **3. Momento ottimale di fecondazione**

La più comune causa di infertilità nella cagna è l'accoppiamento al momento sbagliato. La determinazione del momento ottimale per l'accoppiamento può essere difficile nella cagna, a causa della significativa variabilità individuale del giorno dell'ovulazione e della scarsa correlazione tra il momento dell'ovulazione e l'estro comportamentale. Il momento di massima fertilità sembra essere quello che va dal giorno dell'ovulazione fino a 4 giorni dopo. Se l'accoppiamento avviene in uno qualsiasi di questi giorni, le differenze di tasso di gravidanza o numerosità della cucciolata sono molto basse, mentre un accoppiamento più precoce o tardivo determina tassi di gravidanza minori e cucciolate meno numerose. Si ritiene che il momento del picco di fertilità inizi subito prima dell'inizio del periodo di fertilizzazione, perché gli spermatozoi devono essere capacitati nell'apparato riproduttore femminile e questo processo richiede circa 6 ore. Il metodo migliore per prevedere il momento ottimale per l'accoppiamento è quello di determinare il giorno dell'ovulazione.

#### **4. Monitoraggio del calore**

##### **4.1. Probabilità di successo di una fecondazione in base alla metodica di monitoraggio utilizzata**

Le probabilità di successo di un evento fecondativo basato sulla sola osservazione del comportamento variano dal 20 al 30%.

Se ci si basa sulla sola esecuzione della colpocitologia si può arrivare al 60 – 65%. Questa bassa percentuale è dovuta al fatto che questa metodica consente di valutare le variazioni del tasso ematico di estrogeni ma non permette di sapere se l'ovulazione è avvenuta. È inoltre possibile essere tratti in inganno dalle notevoli variazioni individuali nell'entità della cheratinizzazione dell'epitelio: in alcune cagne è infatti normale osservare durante l'estro una presenza pressochè esclusiva di cellule cheratinizzate nello striscio vaginale, mentre in altre la cheratinizzazione riguarda un numero nettamente inferiore di elementi cellulari.

Utilizzando la vaginoscopia le percentuali di successo arrivano all'80 – 85%.

Attraverso un accurato monitoraggio della progesteronemia si può arrivare al 95% di possibilità di successo.

Un ulteriore passo avanti nel monitoraggio dei calori nell'ottica di individuare l'esatto momento in cui sottoporre la cagna a fecondazione è stato compiuto con l'adozione del monitoraggio ecografico dell'ovulazione. Tuttavia questa tecnica prevede che l'operatore sia fornito di un ottimo ecografo, che abbia una formazione e una pratica tali da consentirgli di visualizzare l'evento in oggetto e che ci sia la possibilità di sottoporre la cagna a monitoraggio almeno due volte al giorno. Questi limiti fanno sì che questa metodica sia per il momento impiegata solo in casi di particolari difficoltà di concepimento dovute a eventi patologici o all'impiego di seme congelato per la IA.

## **4.2. Monitoraggio dei calori attraverso la colpocitologia, la progesteronemia e la vaginoscopia**

### **4.2.1. La colpocitologia**

Si tratta di una metodica diagnostica d'elezione per quanto riguarda la riproduzione nella specie canina, facilmente eseguibile a livello ambulatoriale, poco costosa, ed essenziale per identificare il momento del ciclo estrale e determinare il momento dell'ovulazione nella prospettiva di un accoppiamento o di una IA. Durante l'anestro l'epitelio della vagina è costituito da due o tre strati di cellule: le cellule basali e quelle parabasali. Con l'approssimarsi del calore lo spessore dell'epitelio aumenta come conseguenza di una maggiore stratificazione delle cellule. Conoscere ed identificare i tipi cellulari coinvolti in questo fenomeno è essenziale per riconoscere i vari momenti del ciclo estrale: ogni periodo del ciclo è infatti caratterizzato dalla diversa distribuzione delle cellule dell'epitelio vaginale. È però necessario sottolineare come, ai fini di un accurato monitoraggio dei calori, sia importante valutare l'evoluzione di queste caratteristiche con l'esecuzione della metodica in momenti differenti, mentre le informazioni ottenibili da un singolo striscio risulteranno di difficile interpretazione. È inoltre opportuno sottolineare come, per un corretto monitoraggio del ciclo estrale, sia sempre opportuno associare all'esame colpocitologico il dosaggio del progesterone ematico. Infatti la sola osservazione della citologia vaginale non consente di ottenere la massima precisione nell'interpretazione delle fasi estrali, senza dimenticare che le variazioni individuali non sono rare e potrebbero indurre a errori. Infine occorre ricordare come attraverso l'esecuzione della colpocitologia sia inoltre possibile osservare dei tipi cellulari che non hanno alcuna relazione col ciclo estrale ma che rivestono grande importanza per fini diagnostici diversi: è il caso delle cellule correlabili ad un evento infiammatorio o infettivo.

Esecuzione dello striscio vaginale. La raccolta delle cellule della mucosa vaginale è facilmente effettuabile con l'utilizzo di un tamponcino di cotone sterile, precedentemente inumidito con soluzione fisiologica. Si allontanano tra loro le labbra vulvari (a tale scopo l'operatore può a piacimento utilizzare le dita o uno speculum) e si introduce il tampone verticalmente subito al di sotto della commessura dorsale, facendo bene attenzione a non accedere alla fossa clitoridea, sede particolarmente sensibile che, se stimolata, potrebbe provocare dolore e agitazione nella cagna. Raggiunta la volta della vagina il tampone deve essere diretto orizzontalmente per raggiungerne il fondo, e quindi ruotato delicatamente per raccogliere le cellule. Una volta estratto, il tampone viene fatto rotolare su un vetrino evitando di farlo strisciare per non danneggiare le cellule. Si raccomanda di eseguire in questo modo 2 o 3 linee sul vetrino, senza sovrapporle, per una migliore valutazione del campione. Dopo qualche minuto di attesa per permettere al campione di asciugarsi si può procedere alla fissazione. Per questo scopo sono in commercio dei fissatori spray, ma una metodica semplice ed economica può consistere nell'immersione del vetrino in una miscela 1/1 di alcool al 100% ed etere. Le colorazioni più usate nella colpocitologia sono la Wrights-Giemsa ("Diff-Quick") e la "Harris - Shorr". La prima, tramite l'immersione del vetrino in un fissativo e due coloranti, mette soprattutto in evidenza la morfologia cellulare e le cellule ematiche; permette di evidenziare la presenza di granulociti polimorfonucleati, ed è quindi raccomandata quando si sospetti un'infezione genitale. La seconda, da effettuarsi con 12 immersioni del campione in altrettanti reagenti, è basata sull'affinità tintoriale per i coloranti basofili o acidofili, e mette in evidenza il grado di degenerazione delle cellule e l'indice eosnofilico, ovvero il rapporto tra le cellule acidofile e il numero totale delle cellule che possono andare incontro a cheratinizzazione. Questo parametro risulterà importante per la scelta del momento e del numero di inseminazioni o di monte da far

effettuare alla cagna. Quest'ultima è la colorazione di scelta per il monitoraggio dei calori nella cagna, sebbene meno pratica da effettuarsi. Esistono tuttavia in commercio dei kit, come il Diajnoestrus RAL®, che non sono altro che delle colorazioni di Harris – Shorr semplificate.

- **Lettura.**

La lettura del risultato si effettua al microscopio. Attraverso l'utilizzo di un basso ingrandimento si apprezzano la maggiore o minore pulizia dello striscio, la presenza di muco, la ricchezza in elementi cellulari e la loro tendenza a disporsi in ammassi, la presenza di leucociti e l'affinità tintoriale, e dunque l'indice eosinofilo. Si passa quindi all'osservazione a forte ingrandimento per valutare l'aspetto delle cellule, la forma e le dimensioni dei nuclei cellulari e il loro rapporto con le dimensioni del citoplasma. Tra le cellule epiteliali si possono osservare: cellule parabasali, cellule intermedie piccole, cellule intermedie medie, cellule intermedie grandi e cellule superficiali. Queste ultime possono presentarsi con nucleo cariolitico o picnotico, oppure esserne sprovviste. Tra le cellule non epiteliali possono essere presenti: cellule della fossa clitoridea, spermatozoi, eritrociti, polimorfonucleati, cellule metaestrali e cellule schiumose.

La diversificazione in diversi tipi delle cellule epiteliali è dovuta alla differenza nell'apporto di nutrimento disponibile per esse. All'aumentare degli strati epiteliali le cellule più lontane dalla membrana basale sono raggiunte da una minore quantità di linfa proveniente dal derma, e questo le porta a sovraccaricarsi di prodotti di degradazione e quindi a mutare aspetto e infine a morire.

- Le cellule parabasali sono situate a ridosso della membrana basale. Sono le cellule più piccole rinvenibili nello striscio vaginale. Hanno forma generalmente rotondeggiante,

rapporto nucleo/citoplasma relativamente alto e nucleo di aspetto denso per la condensazione della cromatina Il loro citoplasma è nettamente basofilo.

- Le cellule intermedie piccole si trovano in posizione più esterna e si presentano dunque leggermente modificate. La loro dimensione è all'incirca doppia rispetto alle cellule parabasali, la forma è rotonda, ovalare o leggermente spigolosa e il nucleo rotondeggiante.

- Le cellule intermedie medie hanno un rapporto nucleo/citoplasma ancora inferiore e presentano nel citoplasma dei piccoli vacuoli eosinofili per il loro contenuto in rifiuti acidi. Tuttavia esse sono ancora sostanzialmente basofile.

- Nelle cellule intermedie grandi queste caratteristiche appaiono ancora aumentate: il profilo cellulare è nettamente spigoloso, il rapporto nucleo/citoplasma diminuisce e la presenza di sostanze di rifiuto eosinofile citoplasmatiche aumenta.

- Le cellule superficiali sono caratterizzate da un progressivo stato di cheratinizzazione e di degenerazione. Sono il tipo cellulare di maggiori dimensioni. I loro bordi sono piatti o ripiegati, il nucleo è generalmente molto piccolo e può presentarsi picnotico o frammentato, oppure essere completamente assente.

- Le cellule metaestrali sono tipiche della fase di cui portano il nome. Si tratta in effetti di cellule intermedie nel cui citoplasma sono presenti dei polimorfonucleati. All'insorgere del metaestro, infatti si ha un improvviso distacco delle cellule durante l'eliminazione dell'epitelio vaginale: si ritrovano così tutti i tipi cellulari contemporaneamente, assieme a cellule degenerate e frammentate, e un gran numero di polimorfonucleati, alcuni dei quali possono penetrare nelle cellule intermedie formando le cellule metaestrali.

- Le cellule schiumose sono cellule intermedie il cui citoplasma contiene dei vacuoli lipidici.

- I globuli rossi provengono dall'utero e sono presenti in gran numero durante il proestro, diminuiscono durante l'estro. Sono invece assenti a partire dal metaestro.
- I globuli bianchi si infiltrano per diapedesi attraverso gli strati cellulari. Se ne possono trovare nello striscio durante l'anaestro e all'inizio del proestro, quando hanno la possibilità di attraversare l'epitelio ancora relativamente sottile. Sono presenti in gran numero durante il metaestro e in caso di vaginite o di piometra.
- Durante l'anaestro si rileva la presenza di detriti cellulari e nuclei isolati in quanto le cellule epiteliali, mancando l'influsso degli ormoni, non si moltiplicano più e finiscono per invecchiare e morire.
- La presenza di cellule della fossa clitoridea è generalmente dovuta ad una errata manualità nell'esecuzione dello striscio.
- Gli spermatozoi sono presenti in caso di striscio eseguito successivamente ad un accoppiamento o ad una inseminazione.

- **Interpretazione dello striscio nelle varie fasi del ciclo.**

**Anestro.** Durante la fase di riposo sessuale la mucosa vaginale è costituita da 4 – 5 strati di cellule epiteliali. Nell'esecuzione dello striscio vaginale si raccolgono poche cellule superficiali, che in questa fase, essendo attive, presentano numerosi granuli basofili all'interno del nucleo. Queste cellule, di aspetto rotondeggiante, sono in massima parte cellule parabasali, con la presenza di qualche cellula intermedia piccola. E' anche presente qualche nucleo isolato e qualche polimorfocleato, mentre risultano assenti gli eritrociti. Il fondo del vetrino appare sporco per la presenza di muco e di detriti cellulari.

**Proestro.** Lo spessore della mucosa vaginale aumenta sotto l'influsso degli estrogeni, che nel proestro raggiungono il loro picco di concentrazione ematica ed

esercitano attività mitogena sulle cellule dell'epitelio. Gli strati cellulari si moltiplicano fino a 200 – 300 e l'apporto nutrizionale diventa più difficoltoso a mano a mano che ci si allontana dalla membrana basale. Le cellule tendono quindi a perdere la loro capacità di esocitosi e ad accumulare di conseguenza un gran numero di vescicole contenenti prodotti della loro degradazione, assumendo progressivamente affinità tintoriale eosinofila. Il citoplasma aumenta via via le proprie dimensioni a scapito del volume nucleare e la taglia delle cellule intermedie va ad aumentare.

All'inizio del proestro lo striscio presenta una netta diminuzione delle cellule parabasali a vantaggio delle intermedie basofile. La progressiva cheratinizzazione cellulare comincia a rendere la colorazione dello striscio più acidofila. Sono presenti numerosi eritrociti e il fondo del vetrino si presenta ancora sporco. Sono ancora presenti alcuni polimorfonucleati.

Coll'avanzare del proestro si apprezza un aumento delle cellule superficiali cheratinizzate e del numero di nuclei picnotici.

Nelle ultime fasi del proestro lo striscio rivela la presenza quasi esclusiva di cellule superficiali in avanzato stato di cheratinizzazione. I nuclei sono picnotici o del tutto assenti.

**Estro.** Su un fondo ormai completamente pulito lo striscio evidenzia la presenza di cellule dai contorni poliedrici disposte in ammassi, il cui nucleo è picnotico o assente. La forte cheratinizzazione di queste cellule rende massimo il rapporto tra gli elementi acidofili e quelli basofili presenti nel vetrino. Questo "picco", che si verifica mediamente 3 giorni dopo il picco degli estrogeni, corrisponde al momento dell'ovulazione nel 70% dei soggetti. I globuli rossi sono rari o assenti, così come i leucociti. Se la cagna si è accoppiata si registra la presenza di spermatozoi.

**Diestro/metaestro.** Lo striscio assume un aspetto "sporco" e ricco di muco. Tra le cellule presenti, di forma nuovamente rotondeggiante, ricompaiono le parabasali e le intermedie. La colorazione diviene progressivamente basofila e si osserva un gran numero di polimorfonucleati, isolati o associati alle cellule parabasali a formare le cellule metaestrali, tipiche di questa fase. La percentuale di elementi nucleati è superiore al 20% del totale.

**Anestro.** La mucosa vaginale ha drasticamente ridotto i propri strati cellulari. Le poche cellule che se ne distaccano presenti sullo striscio privo di muco sono disperse e presentano colorazione basofila. Si tratta prevalentemente di cellule intermedie e parabasali. Assenti i leucociti e gli eritrociti.

#### **4.2.2. Il dosaggio del progesterone**

A differenza della maggior parte dei mammiferi, in cui la secrezione del progesterone è esclusiva del corpo luteo formatosi a seguito dell'ovulazione, i follicoli della cagna vanno incontro alla cosiddetta "luteinizzazione pre-ovulatoria". Questo fenomeno fa sì che l'ormone in oggetto sia rilevabile prima dell'ovulazione, e poichè la curva della sua concentrazione ematica risulta pressochè costante, il suo monitoraggio offre un aiuto indispensabile nell'ottica dell'individuazione del momento giusto per la fecondazione.

Non bisogna tuttavia dimenticare che le differenze individuali nell'aumento della progesteronemia non sono trascurabili e, se in alcuni soggetti si può parlare di "estro lungo", con una curva che si sviluppa in un arco di tempo che può durare 15 giorni, in altri (ad "estro breve") lo stesso processo non richiede che 3 giorni.

Il tasso basale del progesterone, rilevabile durante l'anestro e l'inizio del proestro, non supera i 0,5 ng/ml. 24-48 ore prima del picco di LH la progesteronemia si attesta generalmente intorno a 1 ng/ml, mentre, in corrispondenza del suddetto picco, si trova

tra gli 1,5 e i 2 ng/ml. Gli oociti ovulati sono maturi e fecondabili in corrispondenza di una progesteronemia media di 10 ng/ml. Quando questo valore raggiunge i 20 ng/ml, invece, gli oociti, pur essendo ancora potenzialmente fecondabili, non sono più raggiungibili in quanto in questa fase si è ormai verificata la chiusura della cervice uterina. In questo caso l'unica fecondazione possibile è quella intrauterina.

Riassumendo, il periodo ottimale per l'accoppiamento o l'inseminazione artificiale con seme fresco corrisponde ad una progesteronemia compresa tra i 10 e i 15 ng/ml. Se si ha la possibilità di fecondare la cagna 2 volte si interverrà dunque una prima volta in corrispondenza di una progesteronemia di circa 7 ng/ml ed una seconda circa 2 giorni più tardi, con progesteronemia di circa 12 ng/ml.

Se l'intervento fecondativo è singolo, andrà effettuato sul valore dei 10 ng/ml.

#### **4.2.3. La vaginoscopia**

L'utilizzo dell'endoscopia permette l'osservazione diretta della mucosa vaginale. Nell'ambito di un monitoraggio dei calori questa metodica permette di visualizzare l'effetto del quadro ormonale sulla mucosa. Inoltre l'uso del vaginoscopio può essere d'ausilio per l'osservazione di un quadro di infertilità, per praticare un'inseminazione artificiale, per monitorare casi particolari di parto o di post-partum, oltre che per visualizzare patologie dell'apparato riproduttore di tipo infiammatorio o tumorale, per effettuare delle biopsie e per la ricerca di corpi estranei.

Oltre alla mucosa vaginale l'endoscopia consente di visualizzare l'orifizio uretrale, i tubercoli mediano, craniale e caudale, la cervice.

- **Utilizzo del vaginoscopio nel monitoraggio dei calori:**

**Anestro.** Durante questa fase del ciclo il ridotto spessore dell'epitelio lascia intravedere in trasparenza il corso dei vasi sanguigni. Le pareti interne della vagina appaiono dunque di colore rosato. La vagina assume una forma di un tubo la cui parete interna si presenta pressochè liscia, di diametro circolare. Al centro dell'organo si evidenzia la plica medio-dorsale.

**Proestro.** L'aumento degli estrogeni circolanti si riflette sull'epitelio vaginale con un progressivo ispessimento. Nei primi giorni di questa fase si osserva la comparsa di pieghe semplici longitudinali di profilo arrotondato, dette "pieghe primarie". Si verificano anche le prime secrezioni emorragiche che danno alla mucosa un colore rossastro. Con l'avanzare del proestro e dell'ispessimento della mucosa perpendicolarmente alle pieghe primarie si formano le pieghe secondarie. La mucosa, sottoposta a compressione, diventa biancastra.

**Estro.** Si formano le pieghe terziarie, che contribuiscono a dare alla mucosa un aspetto pieghettato. L'edema caratteristico della fase precedente scompare sotto l'effetto dell'accresciuta progesteronemia e le pieghe appaiono più secche. L'aspetto vaginoscopico appena descritto permette di inserire l'animale nel periodo ottimale per la fecondazione.

**Metaestro.** All'aumentare della concentrazione ematica del progesterone la mucosa vaginale diviene iperattiva, e si retrae al tocco dell'endoscopio. Questo è un chiaro segno che si è ormai al di fuori della possibilità di un accoppiamento o per una IA vaginale, e l'unica possibilità di fecondazione rimasta è data dalla IA endouterina. Il colore della mucosa, a causa del progressivo assottigliamento, da bianco torna a virare verso il rosso. La cervice assume un caratteristico aspetto "a rosetta".

**Diestro.** Col progredire della fase luteinica (gravidica o non gravidica) il diametro del lume si riduce. Inizialmente un'evidente contrazione delle pliche produce un aspetto a rosetta. In seguito l'epitelio piatto, secco e rossastro somiglia a quello osservabile durante l'anaestro.

## **5. Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore del maschio**

L'apparato riproduttore del maschio si compone di due testicoli rivestiti dallo scroto comune ad entrambi, di natura cutanea con pelle morbida, elastica e pigmentata. Aderente al sacco scrotale troviamo il dartos che costituisce intorno a ciascun testicolo un sacco completo che risale fino in prossimità dell'anello inguinale superficiale. Contraendosi, il muscolo cremastere, determina una ascensione brusca del testicolo verso la regione inguinale. L'ultimo involucro che ritroviamo procedendo verso l'interno è la tonaca vaginale, dipendenza del peritoneo, che costituisce la tonaca sierosa del testicolo e del suo cordone (Barone, 2009). Applicato a ciascun testicolo c'è l'epididimo distinto in 3 porzioni: la testa, in corrispondenza del polo superiore del testicolo, il corpo e la coda. Si connette con il dotto deferente e unitamente all'arteria spermatica, al plesso pampiniforme, ai tronchi linfatici e nervosi ed al muscolo cremastere, va a costituire il funicolo spermatico. Serve non solo alla raccolta degli spermatozoi prima dell'eiaculazione ma anche ad effettuare dei cambiamenti della composizione spermatica, come ad esempio la rimozione dei resti citoplasmatici nella parte intermedia dello spermatozoo (Roberts, 1986), ma anche alla maturazione dell'acrosoma e alla preparazione per la motilità (Peña, 2007) e acquistano la capacità di fecondare l'ovocita (Amann, 1982). All'epididimo segue il dotto deferente che sbocca nel tratto pelvico dell'uretra, la quale diviene così il canale urogenitale. Alla porzione pelvica del canale urogenitale sono annesse le ghiandole accessorie, di cui la prostata è la sola presente nel

cane. Nell'atto dell'eiaculazione il secreto prostatico si mescola agli spermatozoi e si forma così lo sperma o liquido seminale. L'uretra è un lungo condotto impari, che serve all'escrezione dell'urina e a quella dello sperma.

Il pene é lungo in media 18 cm (15-20 cm nelle razze di taglia media, 6 cm in quelle molto piccole e 25 cm in cani di taglia grande). L'estremità fissa (radice) è divisa in due branche laterali, i pilastri del pene, fra i quali si trova il bulbo del pene. La parte prossimale della radice contiene i corpi cavernosi. Il tessuto erettile è presente in minima parte, mentre la componente principale è costituita da tessuto fibro-elastico dell'albuginea. Questa particolarità permette all'animale di girarsi dopo la fissazione del glande nelle vie genitali. La parte anteriore del corpo è rappresentata dall'osso del pene, il quale si sviluppa dopo la nascita. Il prepuzio è una porzione di tegumento che copre il glande del pene. (Barone, 2009)

## **6. Raccolta del materiale seminale e valutazione del seme**

Sarà descritto di seguito, solo il prelievo manuale, metodo più comunemente utilizzato per la raccolta del seme nel cane.

Nella maggior parte dei casi la presenza di una femmina in calore contribuisce alla positiva riuscita del prelievo.

Il prepuzio in posizione di riposo viene ritirato sino alla base del pene e una pressione costante viene applicata oltre il bulbo cavernoso premendo tra indice e pollice. Durante l'erezione, il maschio può tentare di effettuare il " nodo" alzando l'arto posteriore sopra il braccio dell'operatore. Il pene in erezione viene quindi ruotato caudalmente di 180°, mantenendo la posizione fino al termine del prelievo.

L'eiaculazione inizia immediatamente dopo l'applicazione della pressione dietro il bulbo del glande e dura in media una decina di minuti. Lo sperma e il liquido prostatico vengono espulsi da contrazioni peristaltiche dei muscoli circondanti l'uretra.

Le caratteristiche del liquido seminale e la valutazione macroscopica, quali l'odore, il volume e il colore saranno controllate durante la raccolta. L'eiaculato del cane è trifasico e comporta una frazione pre-spermatICA o uretrale, composta da liquido prostatico, di colore trasparente; una frazione spermatICA, ricca di spermatozoi, di colore biancastro-grigio; ed una frazione prostatica, composta unicamente da liquido prostatico, di colore fisiologicamente trasparente, che viene rilasciata una volta avvenuta la rotazione del pene.

Se il seme è destinato all'inseminazione artificiale o alla crioconservazione verrà raccolta solo la frazione spermatICA. Tuttavia, tutte le tre frazioni sono raccolte separatamente per valutare l'attitudine riproduttiva del maschio e individuare eventuali patologie, soprattutto di origine prostatica.

Le caratteristiche del seme canino variano notevolmente da soggetto a soggetto, legate alla taglia e all'età dello stallone. Tuttavia, altri fattori quali ad esempio dei fattori ambientali e patologici possono influenzare la quantità e la qualità, come ad esempio problemi metabolici, di alimentazione, alcuni farmaci e le patologie prostatiche.

In generale le caratteristiche del seme in età adulta dovrebbero variare tra i seguenti valori medi:

Taglia	Nana	Media	Grande	Gigante
<b>Volume dell'eiaculato</b>	circa 3ml	circa 4 ml	circa 6 ml	sup. 6 ml
<b>Spermatozoi prodotti (milioni)</b>	circa 300	circa 500	circa 800	circa 1.5 x 10 alla 6/ml

Dei quali più dettagliati:

	<i>Frazione</i>	<i>Frazione spermatICA</i>	<i>Frazione</i>	<i>Eiaculato</i>
<i>Volume(ml)</i>	<i>uretrale</i>		<i>prostatica</i>	<i>completo</i>

<b>Colore</b>	<b>0,5 - 5,0</b>	1,0-4,0	1,0->60	2,5->60
<b>Concentrazione spermatica</b>		4-400 x 10 alla 6/ml		4-400 x 10 alla 6/ml
<b>pH</b>				6,3-6,7

Con una mobilità che va dal 70 al 90% et una motilità progressiva lineare del 40-60%.

Nella valutazione bisogna tener presente il periodo di astinenza dello stallone. Infatti dopo un lungo periodo di astinenza sessuale, nel 13,3% dei soggetti, si può avere un incremento della percentuale dei difetti secondari dello spermatozoo del 2,4-88% (Christiansen, 1984) ed il primo eiaculato potrebbe contenere un numero più elevato di spermatozoi morti (Roberts, 1986) in seguito all' invecchiamento conseguito durante la lunga sosta a livello epididimale (Boucher et al, 1985; Godwinn, 1979; Schafer et al, 1979; Feldman e Nelson, 1996), provocando anomalie acrosomiali, e distacco della testa (Eltes et al, 1982). Nel caso contrario, in seguito a prelievi troppo frequenti, è stato osservato una diminuzione del numero totale di spermatozoi per eiaculato (Taha et al, 1983) con incremento nella ritenzione dei resti citoplasmatici (Boucher et al, 1985).

La valutazione microscopica del seme comporta la motilità, la concentrazione, la vitalità e la morfologia spermatica. La motilità deve essere valutata in tempi immediatamente successivi al prelievo, ponendo una goccia di liquido spermatico su un vetrino porta-oggetto pre-riscaldato a 37°C.

Viene valutata una motilità di massa e una motilità individuale, in relazione anche al loro grado e la tipo di movimento (Feldman e Nelson, 1996). Un eiaculato normale dovrebbe contenere oltre il 70% di spermi dotati di una motilità progressiva rettilinea. Vengono considerati anomali gli spermatozoi dotati di movimenti di rotazione con traiettorie circolari. (Feldman e Nelson, 1996).

In presenza di una concentrazione spermatica troppo elevata, occorrerà far ricorso ad una diluizione con un mestruo appropriato, oppure con la fase prostatica. La capacità di progressione è ritenuta essere un riflesso del suo potenziale fertilizzante (Feldman e Nelson, 1996).

L'impiego dei sistemi computerizzati di tipo CASA (Computer Assisted Sperm Analyzers) offre il vantaggio di ridurre sensibilmente la soggettività di giudizio.

Per concentrazione spermatica si intende il numero totale di spermatozoi per millilitro ed il numero totale degli spermatozoi presenti in un eiaculato si ottiene moltiplicando questa concentrazione per il volume totale ottenuto con il prelievo. Per calcolare la concentrazione spermatica il metodo più frequente è quello che utilizza una camera contaglobuli di cui le più comuni sono quelle di Thoma, di Burkner o di Makler.

La vitalità degli spermatozoi viene espressa in percentuale ed è data dal rapporto tra il numero degli spermatozoi vivi ed il numero totale di spermatozoi. Per poter valutare questo parametro possiamo usare delle apposite colorazioni come quella con l'Eosina-Nigrosina, che si basa sul l'integrità della membrana spermatica. Quest'ultima, quando integra impedisce la colorazione di penetrare all'interno della testa dello spermatozoo, che apparirà bianco su fondo scuro determinato dalla nigrosina. Al contrario, in presenza di spermatozoi danneggiati, l'eosina passerà la barriera citoplasmatica e questi appariranno colorati di rosa. Altri test relativamente frequentemente utilizzati si basano sui principi di osmolarità utilizzando dei test ipo-osmotici di funzionalità della membrana plasmatica (HypoOsmoticSwelling Test: HOS-test).

La morfologia si esegue su striscio di sperma non diluito appositamente fissato e colorato. Dei coloranti appositi quali il Giemsa modificato oppure il Diff-Quick sono quelli più frequentemente utilizzati. Tuttavia alcuni coloranti sono stati specificatamente creati per la loro capacità a mettere in evidenza i difetti accrosomiali come ad esempio il

colorante SpermBlue della società Microptic. L'osservazione si effettua con obiettivo ad immersione (1000x) che permetterà di rilevare le anomalie a carico della testa e dell'accrosoma, del tratto intermedio e della coda. Le anomalie spermatiche vengono classificate in primarie e secondarie, a seconda dell'origine dell'alterazione. Quelle primarie si ritengono dovute ad alterazione della spermatogenesi mentre quelle secondarie, sarebbero per lo più acquisite nel tragitto attraverso i vari segmenti delle vie efferenti oppure causate da traumi successive all'eiaculazione, in particolare in seguito alla manipolazione del campione per la valutazione. Si procederà alla valutazione di almeno 200 spermatozoi. Uno sperma normale dovrebbe comportare oltre il 70% di spermatozoi normali, senza superare il 10% di anomalie primarie ed il 20% di alterazioni secondarie (Meyers-Wallen, 1991). In un seme di buona qualità la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali deve essere uguale o maggiore dell'80% (Johnston, 1991). Altri test quali il dosaggio della cromatina spermatica e la citometria a flusso, nonché la defragmentazione della cromatina sono delle tecniche di grande utilità ma non utilizzate in routine, dovuto all'alto costo delle attrezzature. Tutti i parametri di riferimento concernenti le buone tecniche di laboratorio sull'esame del seme di questa tesi sono state tratte dal manuale di laboratorio per l'esame del liquido seminale WHO (World Health Organisation) 2010, tenendo conto delle specificità del seme canino.

## **7. Tecniche di inseminazione artificiale e fattori che incidono sulla fertilità e sull'efficienza delle diverse tecniche di riproduzione assistita.**

È bene ricordare che le cause di infertilità nella cagna sono molteplici ed una anamnesi accurata è indispensabile per giungere alla soluzione di un problema di questo tipo. È essenziale conoscere le date, il ritmo e la durata dei calori, le eventuali patologie

pregresse, gli eventuali trattamenti farmacologici in corso o passati, i protocolli vaccinali utilizzati, i trattamenti antiparassitari applicati, le tecniche di riproduzione adottate (monta naturale o inseminazione artificiale), la possibile presenza nei riproduttori dell'herpes virus canino o della brucellosi, la possibilità di infezioni all'apparato genitale o urinario, la presenza di altre specie animali a contatto con i riproduttori e l'ambiente in cui questi sono allevati (stato dei ricoveri, temperatura, umidità ecc.).

Fisiologicamente nella vagina di una cagna è presente una moltitudine di microorganismi, senza che questo fatto rappresenti una infezione. Nell'utero sono presenti gli stessi batteri che si trovano nella porzione craniale della vagina. Per indurre una patologia il loro numero deve essere estremamente elevato (da uno ad un massimo di tre tipi batterici in coltura pura) e solo in questo caso parleremo di una infezione. (Marseloo et al., 2004). L'incidenza di patologie infettive sembra essere maggiore in allevamenti di grosse dimensioni rispetto a quelli più piccoli (Fontbonne, 2006). Le infezioni possono alterare la possibilità di concepimento in differenti modi. Infatti, nella vagina gli agenti infettivi potrebbero avere un'attività spermicida, oppure agire sulla motilità spermatica causandone ciliostasi. Durante il periodo di proestro ed estro, potrebbero penetrare all'interno dell'utero, creando un ambiente ostile a spermatozoi ed oociti, interferendo con lo sviluppo dell'embrione e provocarne la morte (Fontbonne, 2006). Solo in caso di infezione avverata e dopo aver effettuato un antibiogramma, potremmo iniziare un protocollo antibiotico, utilizzando preferibilmente una terapia per via generale. Al contrario un uso incontrollato degli antibiotici può provocare gravi squilibri nella flora vaginale, finendo per causare fenomeni di resistenza ed infezioni causate da batteri opportunisti divenuti multi-resistenti. L'utilizzo di trattamenti locali è sconsigliabile, perché in caso di cervice pervia sostanze potenzialmente irritanti potrebbero giungere al lume uterino compromettendo la fertilità. Se al contrario il collo

dell'utero fosse chiuso i trattamenti locali non avrebbero nessuna possibilità di raggiungere l'utero stesso, risultando di conseguenza inutili.

Durante la gestazione, ogni medicinale somministrato alla cagna deve essere considerato in funzione di una embriotossicità potenziale. Nell'eventualità in cui la cagna dovesse necessitare di un'anestesia in prossimità del parto saranno da preferire gli anestetici locali o comunque i farmaci che più difficilmente passano attraverso la barriera placentare.

L'accoppiamento naturale è considerato la metodica di riproduzione più efficace in termini di fertilità. La percentuale di concepimento, infatti, è riportata essere intorno al 90% (Farstad, 1984), con dei range di gravidanza che vanno dall'84,5 % al 100% (England et al., 2009; Silva et al., 1995; Van Haaften et al., 1989). Con l'inseminazione artificiale in seme fresco con deposito vaginale sono stati riportati dei risultati variabili con range dal 47,8% al 100% (Concannon et al., 2001; Silva et al., 1996). Se si prende in considerazione il sito di deposito del seme, si è constatato che, utilizzando del seme congelato deposto in sede vaginale, le percentuali di concepimento e la prolificità sono nettamente inferiori rispetto all'inseminazione intrauterina (Linde-Forsberg et al., 1999; Fontbonne et Badinand, 1993). Questo potrebbe avvenire anche con seme fresco ma di qualità non ottimale. Inoltre, rispetto ad una monta naturale l'inseminazione artificiale riduce i rischi di trasmissione delle malattie infettive, consente di utilizzare il seme di animali non più abili alla monta per motivi di età o perché affetti da incapacità fisiche (per esempio in certe razze brachicefale) oppure di soggetti deceduti, o ancora di animali che devono essere sottoposti a trattamenti medici o chirurgici che possono pregiudicarne la qualità. A questi vantaggi si aggiungono la possibilità di conservazione del seme per una utilizzazione futura e la possibilità di esportazione e di conservazione

di materiale genetico evitando il trasporto di animali e i relativi disagi dovuti alla lunghezza del viaggio e alle barriere sanitarie.

Infatti, se eseguita correttamente l'inseminazione artificiale rivela risultati equivalenti a quelli di una monta naturale ed addirittura in alcuni casi incrementa la percentuale di concepimento. È necessario, però, individuare il giorno dell'ovulazione e, per incrementare la possibilità di successo, inseminare più di una volta (Linde- Forsberg e Forsberg, 1993).

Per la corretta esecuzione di una IA le fasi necessarie sono:

- 1) Determinazione del momento dell'ovulazione;
- 2) Prelievo e valutazione del seme;
- 3) Inseminazione propriamente detta.

Il volume del seme da utilizzare sarà determinato in base alla razza e alla metodica utilizzata, e quindi in base alla sede in cui il seme verrà deposto: in caso di inseminazione intravaginale sarà necessario un volume compreso tra i 2,5 e gli 8 ml, in caso di inseminazione intrauterina sarà sufficiente un volume tra i 2 e i 5 ml.

Nel caso in cui il deposito del seme sia stato effettuato in vagina, dopo l'inseminazione, la femmina andrebbe mantenuta con gli arti posteriori sollevati per alcuni minuti, in modo da rendere più veloce l'attraversamento della cervice uterine da parte degli spermatozoi e per evitare che il seme possa defluire all'esterno (Johnston et al., 2001).

### **7.1. L'Inseminazione intravaginale**

Si tratta di una metodica semplice e poco invasiva ma è necessario che il seme sia di buona qualità.

In generale, si può effettuare con diversi tipi di sonda, una tra queste è la **sonda Osiris**.

Si tratta di un tubo di plastica munito di un palloncino all'estremità distale che, gonfiato

dopo l'inserimento in vagina, impedisce il reflusso del seme verso l'esterno e stimola le pareti vaginali, favorendo l'insorgere di contrazioni ascendenti della muscolatura uterina.

## **7.2. L'inseminazione intrauterina**

Questa metodica si rende necessaria quando si ha a disposizione del materiale seminale di scarsa qualità, ad esempio per scarsa concentrazione o ridotta motilità, quando il volume dell'eiaculato è ridotto, o ancora quando la cagna presenta una concentrazione ematica del progesterone ai limiti superiori, purché la colpo citologia non riveli che ci si trovi ormai in fase metaestrale. La deposizione del seme in cavità uterina consente agli spermatozoi di arrivare più rapidamente nella sede di fecondazione ed è soprattutto indicata qualora si utilizzi del seme congelato, che presenta inevitabilmente dei peggioramenti in vitalità, motilità e qualità degli spermatozoi presenti. È possibile effettuare una IA intrauterina attraverso due tecniche: il cateterismo del collo dell'utero e la tecnica chirurgica transaddominale. Il cateterismo del collo uterino si può realizzare attraverso la tecnica scandinava (palpazione transaddominale), che presenta il vantaggio di permettere diverse inseminazioni ma il difetto di costringere l'operatore a lavorare "alla cieca", oppure per via endoscopica, con la possibilità di visualizzare l'interno delle vie genitali. Il catetere scandinavo è costruito di un catetere in metallo (disponibile in 4 dimensioni: 20 cm; 30 cm; 40 cm e 45 cm) e di una guaina in materiale plastico che ne accompagna il percorso fino al collo dell'utero. Quest'ultimo dev'essere localizzato manualmente dall'esterno ed allineato alla direzione della guaina di plastica, per permettere il passaggio del catetere metallico e rendere possibile la successiva deposizione del seme in utero. Con la tecnica endoscopica è sufficiente visualizzare il collo dell'utero ed introdurre un catetere "ureterale" attraverso la cervice. La tecnica

chirurgica, da applicarsi attraverso l'effettuazione di una laparoscopia o di una laparotomia, costringe l'operatore a sottoporre la cagna ad una procedura anestesiológica e ad una operazione chirurgica, che oltre a presentare costi elevati e a consentire un solo intervento fecondativo, è di dubbia conformità ai principi di deontologia e di benessere animale.

Il periodo di maggiore fertilità é in genere raggiunto dopo il secondo calore. È stato riportato da alcuni autori (Christiansen, 1984), un aumento del tasso di concepimento nelle cagne accoppiate al terzo ciclo, ed una riduzione à partire dal quinto. Si consiglia, infatti, di non accoppiare le femmine prima dei 18 mesi di età (Johnston et al., 2001). Borge et al. (2011) e Gavrilovic et al. (2008) hanno riportato che la prolificità è influenzata dall'età delle madri. Cagne di età più avanzata, partorirebbero un numero inferiore di cuccioli, soprattutto nelle razze giganti. Questo decremento di fertilità può essere spiegato col decremento nel numero e nella qualità degli oociti, o con il deterioramento dell'ambiente uterino (Lemoule et al., 2011). In uno studio di Johnson et al. (1987) più del 50% delle cagne sopra i 5 anni non sono state in grado di concepire.

### **7.3. La gestazione**

Definibile come l'intervallo tra l'accoppiamento (o l'inseminazione) e il parto, la gestazione può avere una durata variabile tra i 56 e i 72 giorni. Il motivo di questa notevole variabilità va ricercato nell'intervallo di tempo tra l'accoppiamento e l'ovulazione. Se infatti si valuta la durata della gestazione a partire dall'ovulazione (63 giorni) o dal picco di LH (65 giorni) le variazioni risultano minime, ma nella specie canina la fecondazione degli oociti difficilmente corrisponde al momento dell'accoppiamento. Gli spermatozoi di questa specie mantengono la loro capacità fecondante all'interno delle vie genitali femminili per diversi giorni (da 5 a 7 giorni in

caso di seme fresco, da 24 a 48 ore in caso di seme refrigerato, da 12 a 24 ore in caso di seme congelato) ed è dunque possibile che la fecondazione si verifichi anche in caso di un accoppiamento molto precoce, anche se in questo caso la numerosità della cucciolata potrebbe essere inferiore al reale potenziale della femmina. Al contrario una monta o una fecondazione artificiale per via vaginale eseguite tardivamente rispetto al momento ottimale di fecondazione degli oociti non porterà ad una gravidanza, a seguito dell'avvenuta chiusura del collo uterino. In questo caso solo una fecondazione artificiale intrauterina potrà ancora offrire possibilità di successo. In caso di fecondazione tardiva con collo uterino ancora pervio una parte dei follicoli potrebbe già essere andata incontro a degenerazione e questo darà luogo alla cucciolata ridotta cui si è accennato sopra. Inoltre in questo caso la fecondazione, essendo avvenuta immediatamente a ridosso del salto, darà origine ad una gestazione di durata apparentemente molto più breve di quella possibile con un accoppiamento precoce, e questo spiega l'importante variabilità temporale della gravidanza stessa. Un altro fattore che può agire sulla durata della gestazione è proprio il numero dei feti presenti (e dunque anche la razza): se questo numero è particolarmente basso, infatti, la gestazione potrà durare più a lungo, come conseguenza di un minore stimolo al parto. Viceversa una cucciolata numerosa porterà alla gestante un maggiore stress, che si tradurrà in una massiccia produzione di ACTH e di cortisolo. Questo ormone, attraversando la barriera placentare, stimolerà la produzione di prostaglandine e ossitocina che agiscono a livello del miometrio incrementandone le contrazioni, e a livello ovarico determinando una vasocostrizione con diminuzione dell'irrorazione dell'organo. Questi effetti provocano sull'ovaio una situazione di sofferenza cellulare con conseguente diminuzione della produzione di progesterone in preparazione al parto. Il progesterone è l'ormone che rende possibile il mantenimento della gestazione. Il suo tasso ematico raggiunge un picco variabile tra i 30

e i 60 ng/ml tra i 5 e i 15 giorni post-ovulazione. Se il livello ematico dell'ormone è insufficiente si parla di insufficienza luteale. In caso di insufficienza luteale, per portare avanti la gravidanza si rende necessaria la somministrazione esogena di progesterone. Sebbene non sia conosciuto il livello minimo dell'ormone che possa consentire il mantenimento della gravidanza, è noto che una progesteronemia inferiore ai 2 ng/ml che si protragga per due giorni porta all'aborto. Prima di procedere alla somministrazione di progesterone è bene che la diagnosi di insufficienza luteale sia certa, dal momento che un eccesso dell'ormone può predisporre i feti allo sviluppo di ectopie testicolari. Per supplementare la carenza ormonale si può somministrare progesterone micronizzato (Utrogestan ®: 10mg/kg TID) fino a 2 giorni prima della data prevista per il parto, mimando così il calo fisiologico del P4. Nella specie canina la produzione del progesterone è totalmente a carico dei corpi lutei, la cui funzione è mantenuta attiva da altri ormoni come la prolattina e l'LH.

Nelle due settimane che seguono l'ovulazione e la fecondazione gli embrioni migrano dalle tube (luogo della fecondazione) verso le corna uterine, spostandosi tra queste e il corpo dell'utero prima di trovare la loro sede di impianto tra i 15 e i 17 giorni dopo l'ovulazione.

L'embrione e successivamente il feto sono mantenuti in vita grazie alla formazione della placenta, che consente il passaggio di tutte le sostanze nutritive e dell'ossigeno, e si occupa dell'eliminazione dei rifiuti. Ne consegue che qualunque processo infettivo o infiammatorio che danneggi la placenta esiti invariabilmente in un aborto. Inoltre non bisogna dimenticare che qualunque trattamento farmacologico somministrato alla madre potrebbe passare attraverso la barriera placentare e raggiungere gli embrioni.

A differenza della placenta discoidale dei primati e dei roditori, la placenta della cagna è detta «zonata» ed è di tipo endotelio-coriale. È caratterizzata dalla presenza di un

pigmento verdastro chiamato uteroverdina, che caratterizza il momento del parto della cagna. Le strutture placentari sono formate e attive a partire dal 23° giorno di gestazione.

➤ **Diagnosi di gravidanza**

Una diagnosi di gravidanza effettuata precocemente permette di diagnosticare eventuali problemi, come il verificarsi di aborti precoci totali o parziali o di infezioni a livello uterino. Le tecniche a disposizione sono differenti.

- La palpazione è utilizzabile a partire dalla terza settimana di gestazione. Con questa tecnica, a patto che si abbia sufficiente esperienza, si possono distinguere le ampolle fetali, ricordando che una pressione eccessiva potrebbe danneggiare gli embrioni. In seguito i feti rimangono ben palpabili fino ai 30 – 35 giorni di gravidanza, dopo di che le ampolle tendono ad assumere una forma allungata ed a confluire le une nelle altre, rendendosi difficilmente distinguibili. Con l'utilizzo di un fonendoscopio è possibile auscultare l'attività cardiaca dei cuccioli durante il secondo mese di gravidanza, in particolare negli ultimi 15 giorni prima del parto. Tuttavia la palpazione non consente una diagnosi di gravidanza precoce né un accurato conteggio dei feti. Inoltre questa tecnica non rende possibile verificare l'eventuale instaurarsi di un processo di riassorbimento embrionale né la presenza di processi infiammatori dell'utero apparentemente asintomatici.

- Il dosaggio ormonale del progesterone plasmatico non presenta variazioni nel corso dei 2 mesi successivi all'estro, che la cagna sia gravida oppure no. Questo non lo rende utile nella diagnosi di gravidanza. In effetti il solo ormone tipico di questa fase è la relaxina, prodotta in gran parte dalla placenta. Esistono in commercio dei kit per il dosaggio di questo ormone, che si può effettuare a partire dal 20° - 25° giorno di gravidanza, una volta, cioè, che la placenta sia in grado di produrne una quantità

rilevabile nel sangue. Questa metodica, utilizzata soprattutto per la diagnosi di gravidanze indesiderate da interrompere con eventuali trattamenti abortigeni, non consente né di diagnosticare aborti precoci né di conoscere il numero dei cuccioli.

- L'ecografia rappresenta un metodo diagnostico efficace dopo l'annidamento degli embrioni, che si verifica tra i 18 e i 20 giorni di gravidanza. A partire da questo momento la tecnica rende possibile la visualizzazione delle ampolle fetali e di stimare il numero degli embrioni, anche se questa ultima operazione si presenta spesso difficile per la tendenza delle ampolle a sovrapporsi, eventualità che può portare l'operatore a sottostimarne il numero. Rappresenta la tecnica che consente la diagnosi di gravidanza più precoce, oltre a permettere di rivelare eventuali stati di sofferenza embrionale o fetale, di seguire l'evoluzione dei cuccioli durante tutta la gestazione e, a partire dal 24° giorno, di apprezzarne i battiti cardiaci.

- La radiologia permette una diagnosi di gravidanza assai tardiva, non potendo rivelare la presenza dei cuccioli prima che avvenga l'ossificazione, ovvero attorno al 45° giorno di gravidanza. Prima di questa data, inoltre, l'organogenesi è ancora in corso ed è sconsigliabile sottoporre i feti ad uno studio radiologico in una fase così delicata. Tuttavia, se si effettua uno studio con le due proiezioni latero-laterale e dorso-ventrale della gestante, la tecnica consente di contare esattamente il numero dei cuccioli. È inoltre particolarmente utile in previsione di un parto attraverso taglio cesareo nelle cagne predisposte a problemi distocici dovuti alla taglia dei cuccioli o alla conformazione del bacino della madre, come nel caso delle razze brachicefale.

Nessuna delle tecniche descritte consente di determinare il sesso dei nascituri.

Ciò che importa sapere quando si effettua una diagnosi di gravidanza è se questa si sia instaurata o no. Questo perché se la cagna non risulta gravida è nostro interesse sapere se sia mancata la fecondazione o se si sia verificato un aborto precoce. E in questo senso

solo l'ecografia può darci una risposta, seppure non assoluta, dato che gli aborti che si verificassero prima del momento in cui si rende possibile la diagnosi ecografica rimarrebbero indistinguibili da una fecondazione fallita.

## **PARTE SPERIMENTALE**

Over the last decade, breeders often complain about a decreased fertility. This is particularly true for some breeds such as Newfoundland, Old English Mastiff, English Bulldog, Great Dane and Dogue de Bordeaux. However, this reduced fertility is very hard to evaluate as no reliable scientific data is available. Overall, the number of puppies born in a specific breed per year does not seem to decrease. Whether this decrease in fertility is true or not, is hard to assess as it mainly relies on notions breeders get from the results they achieve within their own kennel.

Most dogs breeders depend on the puppies for financial health of the breeding operation. For breeders, it is very important to have a pregnancy and possibly a high number of viable puppies, because of the high maintenance cost of the kennels. In this thesis, all of the bitches were examined for factors associated with infertility in the kennel breeding management and or a high number of stillbirth puppies. The study was conducted with kennels from Belgium and France.

Many factors influence the reproductive efficiency. While important strides have been made toward a scientific approach of infertility, much of contemporary practice reflects clinical traditions like "the bitch is fertile between the 10th and the 15th days of estrus cycle". The evaluation and treatment of infertile bitch remains a delicate scientific challenge in a breeding management due to the old conceptions that are difficult to eradicate. A careful history can identify symptoms or signs suggesting a specific cause of infertility and thereby helps to focus diagnostic evaluation on the most likely

responsible factors. The aim of this study was to evaluate whether such a decrease in fertility may be observed at a larger scale over a period of 3 years and how this potentially reduced fertility can be managed by adequate specialized veterinary care to improve, if necessary, the reproductive efficiency.

## **1. MATERIALS AND METHODS**

To address this question, some kennels with the 5 breeds named above (Newfoundland, Old English Mastiff, English Bulldog, Great Dane and Dogue de Bordeaux), where decreased fertility was a common complain, were selected during the last 3 years. The number of the total kennels is: 6 for the Newfoundland, 3 for the Hold English Mastiff, 5 for The English Bulldog, 3 for the Great Dane and 3 for the Dogue de Bordeaux.

- Male evaluation

Stallions 'age ranged from 1 to 10 years.

As lack of breeding success is often multifactorial, a general and reproductive examination as a breeding evaluation was done to all the stallions used for reproduction. This included examination of the genitalia, palpation of the testes and prostate, semen evaluation as well as ultrasonography of the testes and prostate.

For all males, sperm quality was considered sufficient for fertilization based on a preliminary semen quality evaluation by full morphological examination as recommended by WHO laboratory manual. The motility and concentration were analyzed again, immediately before each insemination.

- Female evaluation

A total of 153 different bitches were evaluated with a total of 224 estrous cycles between primiparous and pluriparous. Age varied from 18 to 21 months and 3 to 8

years for primiparous and pluriparous bitches respectively. Maximum age for the Old English Mastiffs, Great Dane and Dogue de Bordeaux was 6 years old.

Most of the bitches were fed using a commercial dry food. Great Danes with raw and barf feeding. Water was provided ad libitum.

Profiles and full reproductive history were obtained for each case.

Every bitch was monitored to assess ovulation timing by vaginal cytology to determine the influence of estrogen and progesterone blood level. In some cases, such as insemination with chilled and frozen semen, the ovulation was detected by ultrasonography. Blood samples were taken from the brachiocephalic vein and centrifuged immediately. Measurement of blood serum progesterone concentration was performed by 2 different qualified laboratories: one using chemiluminescent assay (Immulite®) and the second one using immunoassay system (miniVIDAS®). The number of breedings was one or two, depending on the evolution of progesterone level, vaginal cytology and the quality of semen. Ovulation was estimated at about 6 ng/ml of progesterone.

Bacteriology was performed when cytological signs of inflammation were present and systematically on Newfoundland.

- Insemination

First insemination was done when the level was about 8 ng/ml and the second insemination 48 hours later, when progesterone was higher than 10 ng/ml but lower than 40 ng/ml. A concordant estrus vaginal cytology was also a prerequisite. When only one insemination was possible, it was performed on progesterone levels between 10 and 20 ng/ml. The same policy was followed for natural breeding. This methodology was adopted in response to considerable individual variations in serum progesterone and vaginal cytology, and taking into consideration that some bitches may ovulate

between 4 and 10 ng/ml of progesterone concentration (Marseloo et al. 2004). The type of insemination (Intravaginal vs Intrauterine) and of semen (fresh, chilled or frozen) was recorded.

- Pregnancy evaluation

Pregnancy diagnosis was performed by ultrasonography on day 25 post-estimated LH surge. Signs of embryo resorption and abnormally short intervals between estrus consistently led to progesterone level assessment throughout pregnancy. When levels were below 17ng/ml or when an abrupt decrease was observed after 2 weeks of pregnancy, three times a day oral supplementation with micronized progesterone was started. Pregnancy diagnosis results and the number of cycles to obtain a gestation were recorded for later data analysis.

- Delivery

The type of delivery: natural, elective and non-elective Caesarean sections and the related details were recorded. The final outcome of the pregnancies including: total number of puppies, number of live vs stillborn puppies were recorded.

N° tot primiparous	N° tot puppies
N° tot pluriparous	N° dead puppies
N° of primiparous + pluriparous	N° alive puppies
N° TCI	N° puppies TCI
N° AI in Vagina	N° puppies AI IV
N° natural breeding	N° puppies natural breeding
N° tot of Artificial Insemination	
	N° dead puppies TCI
N° cycle primiparous	N° dead puppies AI IV
N° cycles pluriparous	N° dead puppies natural breeding
N° tot of cycles	
	N° puppies primiparous
Fresh semen	N° puppies pluriparous
Chilled semen	
Frozen semen	N° dead puppies primiparous
	N° dead puppies pluriparous
n° of pregnancy diagnosis + (primiparous)	
n° of pregnancy diagnosis + (pluriparous)	N° puppies fresh semen
Tot N° of pregnancy diagnosis (PD)	N° puppies chilled semen
	N° puppies frozen semen
Average number of cycles to have a pregnancy (n° tot cycles : P.Diag +) / Breed	
Average number of cycles to have a pregnancy in primiparous	N° dead puppies chilled semen
Average number of cycles to have a pregnancy in pluriparous	N° dead puppies frozen semen
n° c-section	Tot N° of pregnancy diagnosis (PD)
n° natural birth	Postive PD TCI
n° of parturitions	Positive PD IVAI
	Postive PD natural
n° of elective c-section	
n° c-section in emergency	Tot N pups
	N° puppies TCI
n° natural birth primiparous	N° puppies AI IV
n° natural birth pluriparous	N° puppies natural breeding
n° c-section primiparous	
n° c-section pluriparous	N born pups/litter TCI
	N born pups/litter IVAI
% c-section / Breed	N born pups/litter natural cover
% natural birth / Breed	

## 2. STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed by the department of biostatistics of the Veterinary Faculty of the University of Liège. Categorical variables were compared using a Chi-squared test. A p-value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

RStudio logical (R version 3.3.2) was used to analyse data

The software Statistica 13.0 was used for the Anova analysis.

## 3. RESULTS

### **Raw data**

The per breed distribution of the collected data regarding the number of animals, parity, type of insemination and semen preparation, the number of cycles, and pregnancy diagnosis is given in Table 1.

The per breed distribution of outcome of delivery (number of live and dead puppies), based on semen preparation and type of insemination and the mean number of puppies per category are given in Table 2.

Breed	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue de Bordeaux
N° tot bitches	35	19	48	23	28
N° tot primiparous	35	19	48	23	28
N° tot pluriparous	14	8	16	12	21
N° of primiparous + pluriparous	49	27	64	35	49
N° TCI	39	8	44	16	8
N° AI in Vagina	14	23	23	13	57
N° natural breeding	3	0	1	19	3
N° tot of Artificial Insemination	53	31	67	29	65
N° cycle primiparous	35	19	48	23	28
N° cycles pluriparous	21	12	20	25	40
N° tot of cycles	56	31	68	48	68
Fresh semen	53	30	64	29	61
Chilled semen	0	1	3	0	2
Frozen semen	0	0	0	0	2
n° of pregnancy diagnosis + (primiparous)	34	19	44	16	26
n° of pregnancy diagnosis + (pluriparous)	21	9	19	15	36
Tot N° of pregnancy diagnosis (PD)	55	28	63	31	62
Average number of cycles to have a pregnancy (n° tot cycles : P.Diag +) / Breed	1	1	1	1,5	1
Average number of cycles to have a pregnancy in primiparous	1	1	1	1,4	1
Average number of cycles to have a pregnancy in pluriparous	1	1,3	1	1,66	1
n° c-section	18	28	63	12	17
n° natural birth	37	0	0	19	43
n° of parturitions	55	28	63	31	60
n° of elective c-section	8	28	63	9	12
n° c-section in emergency	10	0	0	3	5
n° natural birth primiparous	20	0	0	12	18
n° natural birth pluriparous	17	0	0	7	25
n° c-section primiparous	14	19	44	4	8
n° c-section pluriparous	4	9	19	8	9
% c-section / Breed	33	100	100	39	28
% natural birth / Breed	67	0	0	61	72

**Table 1:** Per breed distribution of the collected data regarding the number of animals, parity, type of insemination and semen preparation, the number of cycles, and pregnancy diagnosis.

<b>Breeds</b>	<b>Newfoundland</b>	<b>Old English Mastiff</b>	<b>English Bulldog</b>	<b>Great Dane</b>	<b>Dogue de Bordeaux</b>
<i>N° tot puppies</i>	437	226	387	292	427
<i>N° dead puppies</i>	48	14	56	16	50
<i>N° alive puppies</i>	389	212	331	276	377
<i>N° puppies TCI</i>	308	157	281	90	44
<i>N° puppies AI IV</i>	105	69	100	28	351
<i>N° puppies natural breeding</i>	24	0	6	174	32
<i>N° dead puppies TCI</i>	24	2	42	1	2
<i>N° dead puppies AI IV</i>	17	12	14	1	47
<i>N° dead puppies natural breeding</i>	7		0	14	1
<i>N° puppies primiparous</i>	250	157	271	180	188
<i>N° puppies pluriparous</i>	146	69	116	112	239
<i>N° dead puppies primiparous</i>	21	7	34	8	14
<i>N° dead puppies pluriparous</i>	27	7	22	8	36
<i>N° puppies fresh semen</i>	413	221	375	118	386
<i>N° puppies chilled semen</i>		5	12		3
<i>N° puppies frozen semen</i>					6
<i>N° dead puppies chilled semen</i>		1	3		0
<i>N° dead puppies frozen semen</i>					2
<i>Tot N° of pregnancy diagnosis (PD)</i>	55	28	63	31	62
<i>Postive PD TCI</i>	38	19	42	11	8
<i>Positive PD IVAI</i>	14	9	20	4	51
<i>Postive PD natural</i>	3	0	1	16	3
<i>N born pups/litter TCI</i>	8,1	8,3	6,7	8,2	5,5
<i>N born pups/litter IVAI</i>	7,5	7,7	5,0	7,0	7,2
<i>N born pups/litter natural cover</i>	8,0	0,0	6,0	10,9	10,7

Table 2: Per breed distribution of outcome of delivery (number of live and dead puppies), based on semen preparation and type of insemination and mean number of puppies per category.

## Statistical analyses

### a) Parity:

Observed data:

	<i>Newfoundland</i>	<i>Old English Mastiff</i>	<i>English Bulldog</i>	<i>Great Dane</i>	<i>Dogue Bordeaux</i>	<i>TOTAL</i>
<i>Primiparous</i>	35	19	48	23	28	<b>153</b>
<i>Pluriparous</i>	14	8	16	12	21	<b>71</b>
<b><i>TOTAL</i></b>	<b>49</b>	<b>27</b>	<b>64</b>	<b>35</b>	<b>49</b>	<b>224</b>

#### **A. effects of parity and breed:**

X-square test of independence:

Value of X-squared: 4.5275; degree of freedom = 4; probability = 0.3393

- No link between parity and breed.

#### **B. Effect of parity:**

Chi-square adjustment test (On the total as no differences between breeds):

X-squared = 30.018, df = 1, p-value = 4.281e-08

- In general, significantly more primiparous than pluriparous

**b) Insemination type:**

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	<b>TOTAL</b>
TCI	39	8	44	16	8	<b>115</b>
IV AI	14	23	23	13	57	<b>130</b>
Natural	3	0	1	19	3	<b>26</b>
<b>TOTAL</b>	<b>53</b>	<b>31</b>	<b>67</b>	<b>29</b>	<b>65</b>	<b>245</b>

**A. Link between insemination and breeds:**

Independence chi-square test not applicable because expected values less than 5.

Fisher test with simulation Monte Carlo (20,000 replicates):

Probability is: '**0.00005**'

- Link between 'insemination' and 'breed' type
- **Comparison of breeds according to the type of insemination:**

**TCI vs AI IV:**

Chi-square test of independence:

Value of  $X^2$ : 62.196, degree of freedom: 4, probability =  **$1.002 \times 10^{-12}$**

- Difference between TCI and AI IV depending on the breed.

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

X-squared =

NF vs. OEM: = 18.117, df = 1, **p-value =  $2.078 \times 10^{-5}$**  Odds ratio = 8.009 (= ratio of TCI to AI IV is 8 times greater in NF than in OEM)

OEM vs EB: = 13.523, df = 1, **p-value =  $0.0002356$**  Odds ratio = 5.5 (= ratio between TCI and AI IV is 5.5 times greater in EB than in OEM)

EB vs GD: = 0.95193, df = 1, p-value = 0.3292 No difference.

GD vs DB: = 19.379, df = 1, **p-value = 1.072<sup>e</sup>-05** Odds ratio = 8.77 (= ratio of TCI to AI IV is 8.77 times greater in GD than in DB)

NF vs EB: = 0.86889, df = 1, p-value = 0.3513 No difference.

NF vs GD: = 2.8773, df = 1, p-value = 0.08984 No difference.

NF vs DB: = 45.742, df = 1, **p-value = 1.349<sup>e</sup>-11** Odds ratio = 19.85 (= ratio of TCI to AI is 19.85 times greater in NF than in DB)

OEM vs GD: = 5.3838, df = 1, p-value = 0.02033 No difference.

OEM vs. DB: = 2.7537, df = 1, p-value = 0.09703 No difference.

EB vs DB: = 39.352, df = 1, **p-value = 3.539<sup>e</sup>-10** Odds ratio = 13.63 (= ratio of TCI to AI is 13.63 times greater in EB than in DB)

### **TCI vs Natural:**

Independence chi-square test not applicable because expected values less than 5.

Fisher test with simulation Monte Carlo (20,000 replicates):

Probability is: **0.00005**

- Difference between TCI and Natural according to race.

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

**NF vs OEM:** P-value = 1 No difference; **OEM vs EB:** P-value = 1 No difference; **EB vs GD:**

P-value = **5.26<sup>e</sup>-08** Odds ratio = 49.5629 (= risk of having a CTI is 49.56 times greater in EB than in GD); **GD vs. DB:** P-value = 0.171 No difference; **NF vs EB:** P-value = 0.3493 No

difference; **NF vs GD:** P-value = **6.768<sup>e</sup>-06** Odds ratio = 14.81722 (= risk of having a TCI is 19.85 times greater in NF than in DB); **NF vs DB:** P-value = 0.09575 No difference;

**OEM vs GD:** P-value = 0.005593 No difference; **OEM vs. DB:** P-value = 0.2281 No difference; **EB vs DB:** P-value = 0.02111 No difference.

### **AI IV vs Natural:**

Independence chi-square test not applicable because expected values less than 5.

Fisher test with simulation Monte Carlo (20,000 replicates):

Probability is: **0.00005**

- Difference between AI IV and Natural according to race.

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

**NF vs OEM:** p-value = 0.06883 No difference; **OEM vs EB :** P-value = 1 No difference; **EB vs GD:** P-value = **1.317<sup>e</sup>-05** Odds ratio = 31.5879 (= ratio between AI IV and natural is 31.59 times greater in EB than in GD); **GD vs. DB:** P-value = **1.331<sup>e</sup>-08** Odds ratio = 26.38 (= ratio between AI IV and natural is 26.38 times greater in DB than in GD); **NF vs EB:** P-value = 0.2896 No difference; **NF vs GD:** P-value = 0.006913 No difference; **NF vs DB:** P-value = 0.1175 No difference; **OEM vs GD:** P-value = 0.005593 No difference; **OEM Vs. DB:** P-value = **1.42<sup>e</sup>-060** dds ratio = incalculable as null value; **EB vs DB:** P-value = 0.5569 No difference.

- **Comparison of insemination type for each breed separately:**

**NF:** X-squared = 36.464, df = 2, **p-value = 1.207<sup>e</sup>-08** Significant difference between insemination type; chi-square fit test 2 to 2 (threshold of significance =  $0.05 / 3 = 0.0167$ ); TCI vs. AI IV: X-squared = 11.792, df = 1, **p-value = 0.0005947** Significantly more TCI than AI IV; AI IV vs Natural: X-squared = 7.1176, df = 1, **p-value = 0.007633** Significantly more AI IV than Natural; TCI vs Natural: X-squared = 30.857, df = 1, **p-value = 2.777<sup>e</sup>-08** Significantly more TCI than Natural

**OEM:** X-squared = 26.387, df = 2, **p-value = 1.863<sup>e</sup>-06** Significant difference between insemination type; chi-square fit test 2 to 2 (threshold of significance =  $0.05 / 3 = 0.0167$ ); TCI vs. AI IV: X-squared = 7.2581, df = 1, **p-value = 0.007058** Significantly more

AI IV than TCI; AI IV vs Natural: X-squared = 23, df = 1, **p-value = 1.62<sup>e</sup>-06** Significantly more AI than Natural; TCI vs Natural: X-squared = 8, df = 1, **p-value = 0.004678** Significantly more TCI than Natural

**EB:** X-squared = 40.794, df = 2, **p-value = 1.386<sup>e</sup>-09** Significant difference between insemination type; chi-square fit test 2 to 2 (threshold of significance = 0.05 / 3 = 0.0167); TCI vs. AI IV: X-squared = 6.5821, df = 1, **p-value = 0.0103** Significantly more ICT than AI IV; AI IV vs Natural: X-squared = 20.167, df = 1, **p-value = 7.098<sup>e</sup>-06** Significantly more AI IV than Natural; TCI vs Natural: X-squared = 41.089, df = 1, **p-value = 1.455<sup>e</sup>-10** Significantly more TCI than Natural

**GD:** X-squared = 1.125, df = 2, p-value = 0.5698 No difference between insemination type

**DB:** X-squared = 78.559, df = 2, **p-value <2.2<sup>e</sup>-16** Significant difference between insemination type

Chi-square adjustment test 2 to 2 (threshold of significance = 0.05 / 3 = 0.0167)

TCI vs. AI: X-squared = 36.938, df = 1, **p-value = 1.219<sup>e</sup>-09** Significantly more AI than TCI; AI vs Natural: X-squared = 48.6, df = 1, **p-value = 3.139<sup>e</sup>-12** Significantly more AI than Natural; TCI vs Natural: X-squared = 2.2727, df = 1, p-value = 0.1317 No difference between TCI and Natural.

### c) Type of cycle:

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	<b>TOTAL</b>
Primiparous	35	19	48	23	28	<b>153</b>
Pluriparous	21	12	20	25	40	<b>118</b>
<b>TOTAL</b>	<b>56</b>	<b>31</b>	<b>68</b>	<b>48</b>	<b>68</b>	<b>271</b>

### A. Link between cycle type and breeds:

Chi-square test of independence: X-squared = 14.533, df = 4, p-value = 0.005774

➤ Link between type of cycle and race.

- **Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of cycle:**

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

**NF vs. OEM:** X-squared = 0.012402, df = 1, p-value = 0.9113 No difference; **OEM vs EB:**

X-squared = 0.8415, df = 1, p-value = 0.359 No difference; **EB vs GD:** X-squared = 6.0912,

df = 1, p-value = 0.01359 No difference; **GD vs. DB:** X-squared = 0.51888, df = 1, p-value

= 0.4713 No difference; **NF vs EB:** X-squared = 0.90775, df = 1, p-value = 0.3407 No

difference; **NF vs GD:** X-squared = 2.2284, df = 1, p-value = 0.1355 No difference; **NF vs.**

**DB:** X-squared = 5.5868, df = 1, p-value = 0.0181 No difference; **OEM vs GD:** X-squared =

1.3529, df = 1, p-value = 0.2448 No difference; **OEM vs. DB:** X-squared = 3.4546, df = 1,

p-value = 0.06308 No difference; **EB vs DB:** X-squared = 11.93, df = 1, p-value =

0.0005524 Odds ratio = 3.43 (= ratio between primiparous and pluriparous is 3.43 times greater in EB than in DB)

- **Comparison of the cycle type for each breed separately:**

**NF:** X-squared = 3.5, df = 1, p-value = 0.06137 No difference between cycle type.

**OEM:** X-squared = 1.5806, df = 1, p-value = 0.2087 No difference between cycle type.

**EB:** X-squared = 11.529, df = 1, p-value = 0.000685 Significantly more primary cycle than pluriparous

**GD:** X-squared = 0.083333, df = 1, p-value = 0.7728 No difference between cycle type.

**DB:** X-squared = 2.1176, df = 1, p-value = 0.1456 No difference between cycle type.

#### d) Gestation type:

Observed data:

	Newfoundla nd	Old English Mastiff	English Bulldo g	Great Dane	Dogue Bordeaux	<b>TOTAL</b>
Primiparo us	34	19	44	16	26	<b>139</b>
Pluriparou s	21	9	19	15	36	<b>100</b>
<b>TOTAL</b>	<b>55</b>	<b>28</b>	<b>63</b>	<b>31</b>	<b>62</b>	<b>239</b>

#### A. Relationship between gestation and breeds:

Chi-square test of independence: X-squared = 12.17, df = 4, p-value = 0.01613

➤ Significant link between type of gestation and race.

- Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of gestation:

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

X-squared

**NF vs. OEM:** = 0.29317, df = 1, p-value = 0.5882; **OEM vs EB:** = 0.035825, df = 1, p-value = 0.8499; **EB vs GD:** = 2.9902, df = 1, p-value = 0.08377; **GD vs. DB:** = 0.78151, df = 1, p-value = 0.3767; **NF vs EB:** = 0.84356, df = 1, p-value = 0.3584; **NF vs GD:** = 0.8484, df = 1, p-value = 0.357; **NF vs DB:** = 4.6117, df = 1, p-value = 0.03175; **OEM vs GD:** = 1.6088, df = 1, p-value = 0.2047; **OEM vs. DB:** = 5.1843, df = 1, p-value = 0.02279: No difference.

**EB vs DB:** = 9.8757, df = 1, p-value = 0.001675 Odds ratio = 3.21 (= ratio between primiparous and pluriparous is 3.21 times greater in EB than in DB)

- Comparison of the cycle type for each breed separately:

**NF:** X-squared = 3.0727, df = 1, p-value = 0.07962 No difference between cycle type.

**OEM:** X-squared = 3.5714, df = 1, p-value = 0.05878 No difference between cycle type.

**EB:** X-squared = 9.9206, df = 1, **p-value = 0.001634** Significantly more primary cycle than pluriparous

**GD:** X-squared = 0.032258, df = 1, p-value = 0.8575 No difference between cycle type.

**DB:** X-squared = 1.6129, df = 1, p-value = 0.2041 No difference between cycle type.

**e) Primiparous: positive vs negative diagnosis**

Observed data :

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	TOTAL
Gestation +	34	19	44	16	26	<b>139</b>
Gestation -	1	0	4	7	2	<b>14</b>
<b>N° cycle</b>	<b>35</b>	<b>19</b>	<b>48</b>	<b>23</b>	<b>28</b>	<b>153</b>

**A. Relationship between diagnosis and breeds:**

Independence chi-square test not applicable because expected values less than 5.

Fisher test:

Probability is: **0.0075**

➤ Link between diagnosis and race.

• **Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of gestation:**

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

Fisher test:

**NF vs OEM:** p-value = 1; **OEM vs EB:** p-value = 0.5713; **EB vs GD:** p-value = 0.03115; **GD vs DB:** p-value = 0.06101; **NF vs EB:** p-value = 0.3913: No difference.

**NF vs GD:** **p-value = 0.004732** Odds ratio = 14.20 (= ratio between gestation + and gestation - is 14.20 times greater in NF than in GD); **NF vs DB:** p-value = 0.5805; **OEM vs GD:** p-value = 0.01095; **OEM vs DB:** p-value = 0.5079; **EB vs DB:** p-value = 1: No difference.

- **Comparison of the cycle type for each breed separately:**

X-squared

**NF:** = 31.114, df = 1, **p-value = 2.433<sup>e</sup>-08** Significantly more diagnosis + than negative

**OEM:** = 19, df = 1, **p-value = 1.307<sup>e</sup>-05** Significantly more diagnosis + than negative

**EB:** = 33.333, df = 1, **p-value = 7.764<sup>e</sup>-09** Significantly more diagnosis + than negative

**GD:** = 3.5217, df = 1, p-value = 0.06057 No difference.

**DB:** = 20.571, df = 1, **p-value = 5.745<sup>e</sup>-06** Significantly more diagnosis + than negative

**f) Pluriparous: positive vs negative diagnosis**

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	TOTAL
Gestation +	21	9	19	15	36	<b>100</b>
Gestation -	0	3	1	10	4	<b>18</b>
<b>Nbre cycle</b>	<b>21</b>	<b>12</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>40</b>	<b>118</b>

**A. Relationship between diagnosis and breeds:**

Independence chi-square test not applicable because expected values less than 5.

Fisher test: Probability: **0.0007721**

➤ Link between diagnosis and race.

- **Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of gestation:**

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

Fisher Test

NF vs OEM: p-value = 0.04032; OEM vs EB: p-value = 0.1361; EB vs GD: p-value = 0.01232; NF vs EB: p-value = 0.4878; NF vs DB: p-value = 0.2885; OEM vs GD: p-value = 0.4757; OEM vs DB: p-value = 0.3311; EB vs DB: p-value = 0.6563: No difference.  
 GD vs DB: p-value = 0.00607 No difference (but close to significance).  
 NF vs GD: **p-value = 0.0008884** Odds ratio = incalculable as zero value

- **Comparison of the cycle type for each breed separately:**

X-squared

NF: = 21, df = 1, **p-value = 4.593<sup>e</sup>-06** Significantly more diagnosis + than negative

OEM: = 3, df = 1, p-value = 0.08326 No difference.

EB: = 16.2, df = 1, **p-value = 5.699<sup>e</sup>-05** Significantly more diagnosis + than negative

GD: = 1, df = 1, p-value = 0.3173 No difference.

DB: = 25.6, df = 1, **p-value = 4.2<sup>e</sup>-07** Significantly more diagnosis + than negative

**g) Type of Birth: Caesarean vs. Natural**

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	TOTAL
C-section	18	28	63	12	17	<b>138</b>
Natural birth	37	0	0	19	43	<b>99</b>
<b>Total</b>	<b>55</b>	<b>28</b>	<b>63</b>	<b>31</b>	<b>60</b>	<b>237</b>

**A. Relationship between type of birth and breeds:**

Chi-square test of independence: X-squared = 106.89, df = 4, **p-value < 2.2<sup>e</sup>-16**

➤ Significant relationship between type of birth and race.

- **Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of gestation:**

Look at breed 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

**NF vs OEM:** X-squared = 33.987, df = 1, **p-value = 5.547<sup>e</sup>-09**

Odds Ratio not calculable as zero value. But we see that more natural than cesarean in NF and on the contrary in OEM.

**OEM vs EB:** Test de fisher: p value = 1 No difference.

**EB vs GD:** X-squared = 48.395, df = 1, **p-value = 3.485<sup>e</sup>-12** Odds Ratio not calculable as zero value. But we see that more natural than cesarean in NF and inverted in OEM.

**GD vs DB:** X-squared = 1.0136, df = 1, p-value = 0.314 No difference.

**NF vs EB:** X-squared = 61.741, df = 1, **p-value = 3.917<sup>e</sup>-15**

Odds Ratio not calculable as zero value. But we see that more natural than cesarean in NF and inverted in EB.

**NF vs GD:** X-squared = 0.31237, df = 1, p-value = 0.5762 No difference.

**NF vs DB:** X-squared = 0.26167, df = 1, p-value = 0.609 No difference.

**OEM vs GD:** X-squared = 25.313, df = 1, **p-value = 4.874<sup>e</sup>-07**

Odds ratio not calculable as zero value. But we see that more C-section in OEM and GD C-section/ natural equivalent ratio.

**OEM vs DB:** X-squared = 39.241, df = 1, **p-value = 3.745<sup>e</sup>-10**

Odds ratio incalculable as zero value. But we see that more natural than caesarean in DB and inverted in OEM.

**EB vs DB:** X-squared = 69.418, df = 1, **p-value < 2.2<sup>e</sup>-16**

Odds Ratio not calculable as zero value. But we see that more natural than cesarean in DB and inverted in EB.

- **Comparison of the cycle type for each breed separately:**

**NF:** X-squared = 6.5636, df = 1, **p-value = 0.01041** Significantly more natural birth than C-section

**OEM:** X-squared = 28, df = 1, **p-value = 1.213<sup>e</sup>-07** Significantly more C-section than natural birth

**EB:** X-squared = 63, df = 1, **p-value = 2.067<sup>e</sup>-15** Significantly C-section than natural birth

**GD:** X-squared = 1.5806, df = 1, p-value = 0.2087 No difference

**DB:** X-squared = 11.267, df = 1, **p-value = 0.0007891** Significantly more natural birth than C-section

#### **h) Caesarean section: elective vs emergency**

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	<b>TOTAL</b>
elective	8	28	63	9	12	<b>120</b>
emergency	10	0	0	3	5	<b>18</b>
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>28</b>	<b>63</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>138</b>

#### **A. Relationship between Caesarean section and breeds:**

Independence chi-square test not applicable because expected values less than 5.

Fisher test: Probability: **4.685<sup>e</sup>-10**

➤ Link between cesarean type and breeds

- **Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of gestation:**

Look at races 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

Fisher test:

**NF vs OEM: p-value =  $1.073 \times 10^{-5}$**  Oddsratio not calculable as zero value. But we see that more elective C-section at OEM and NF ratio elective / emergency equivalent

**OEM vs EB: p-value = 1** No difference.

**EB vs GD: p-value =  $0.003258$**  Oddsratio not calculable as zero value. But we see that more elective C-section at OEM and NF ratio elective / emergency equivalent

**GD vs DB: p-value = 1** No difference.

**NF vs EB: p-value =  $2.33 \times 10^{-8}$**  Oddsratio not calculable as zero value. But we see that more elective C-section at EB and at NF ratio elective / emergency equivalent

**NF vs GD: p-value = 0.1414** No difference.

**NF vs DB: p-value = 0.1756** No difference.

**OEM vs GD: p-value = 0.02227** No difference.

**OEM vs DB: p-value =  $0.005065$**  Oddsratio not calculable as zero value. But we see that more elective C-section at OEM and DB ratio elective / emergency equivalent

**EB vs DB: p-value =  $0.0002574$**  Oddsratio incalculable as zero value. But we see that more elective C-section at EB and DB ratio elective / emergency equivalent.

- **Comparison of the cycle type for each breed separately:**

X-squared:

**NF:** = 0.22222, df = 1, p-value = 0.6374 No difference.

**OEM:** = 28, df = 1, **p-value = 1.213<sup>e</sup>-07** Significantly more elective

**EB:** = 63, df = 1, **p-value = 2.067<sup>e</sup>-15** Significantly more elective

**GD:** = 3, df = 1, p-value = 0.08326 No difference.

**DB:** = 2.8824, df = 1, p-value = 0.08956 No difference.

**i) Natural birth : primiparous vs pluriparous**

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	TOTAL
Primiparous	20	0	0	12	18	50
Pluriparous	17	0	0	7	25	49
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>19</b>	<b>43</b>	<b>99</b>

**j) Link between parity and breed:**

Chi-square test of independence: X-squared = 2.6887, df = 2, p-value = 0.2607

➤ No link

**B. Parity effect:**

Chi-square adjustment test (on the total as no differences between breeds): X-squared =

0.010101, df = 1, p-value = 0.9199

➤ No difference between primipare and pluriparous

**k) C-section : primiparous vs pluriparous**

Observed data:

	Newfoundland	Old English Mastiff	English Bulldog	Great Dane	Dogue Bordeaux	TOTAL
Primiparous	14	19	44	4	8	89
Pluriparous	4	9	19	8	9	49
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>28</b>	<b>63</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>138</b>

## A. Relationship between Caesarean section and breeds:

chi-square test of independence not applicable because expected values less than 5.

Fisher test: Probability: **0.0545**

➤ No link but at the limit of significance

- **Comparison of breeds 2 to 2 according to the type of gestation:**

Look at breeds 2 to 2 (bonferroni correction for the significance threshold as we multiply the comparisons => test is significant when  $p < 0.05 / 10 = 0.005$ ):

Fisher test:

**NF vs OEM:** p-value = 0.5223; **OEM vs EB:** p-value = 1; **EB vs GD:** p-value = 0.02269; **GD vs DB:** p-value = 0.7032; **NF vs EB:** p-value = 0.5704; **NF vs GD:** p-value = 0.02434; **NF vs DB:** p-value = 0.0858; **OEM vs GD:** p-value = 0.07938; **OEM vs DB:** p-value = 0.2162; **EB vs DB:** p-value = 0.09348: No difference.

- **Comparison of cycle type for each breed separately:**

X-squared:

**NF:** = 5.5556, df = 1, **p-value = 0.01842** Significantly more primiparous than pluriparous

**OEM:** = 3.5714, df = 1, **p-value = 0.05878** limit of significance

**EB:** = 9.9206, df = 1, **p-value = 0.001634** Significantly more primipara than pluriparous

**GD:** = 1.3333, df = 1, p-value = 0.2482 No difference.

**DB:** = 0.058824, df = 1, p-value = 0.8084 No difference.

**1) Number puppies (dead vs. alive) according to race and type insemination:**

Logistic regression with dependent variable: status (death vs alive) and as independent variables: breed (5 breeds) and type of insemination (ICT, AI IV or natural).

Observed data:

Breed	Insemination type	Deaths	Alive
NF	TCI	24	284
NF	AI IV	17	88
NF	Natural	7	17
OEM	TCI	2	54
OEM	AI IV	12	158
OEM	Natural	0	0
EB	TCI	42	239
EB	AI IV	14	86
EB	Natural	0	6
GD	TCI	1	89
GD	AI IV	1	27
GD	Natural	14	160
DB	TCI	2	42
DB	AI IV	47	304
DB	Natural	1	31

➤ Do not look at the interaction:

Breed effect: **p = 0.0003058**

Insemination effect: **p = 0.0046379**

Odds ratio calculated as the living / dead ratio

If 1 is not part of the confidence interval => odds ratio is significant

Comparison	Odds-ratio	IC 2.5%	IC 97.5%
TCI vs AI IV	<b>1.76</b>	<b>1.19</b>	<b>2.59</b>
TCI vs natural	<b>2.19</b>	<b>1.15</b>	<b>4.06</b>
AI IV vs natural	1.25	0.66	2.28

Comparison	Odds-ratio	IC 2.5%	IC 97.5%
NF vs OEM	<b>0.42</b>	<b>0.21</b>	<b>0.79</b>
NF vs EB	1.41	0.93	2.14
NF vs GD	<b>0.33</b>	<b>0.15</b>	<b>0.65</b>
NF vs DB	0.78	0.49	1.24
OEM vs EB	<b>3.34</b>	<b>1.81</b>	<b>6.56</b>
OEM vs GD	0.77	0.32	1.85
OEM vs DB	<b>1.84</b>	<b>1.02</b>	<b>3.54</b>
EB vs GD	<b>0.23</b>	<b>0.11</b>	<b>0.46</b>

EB vs DB	<b>0.55</b>	<b>0.35</b>	<b>0.88</b>
GD vs DB	<b>2.37</b>	<b>1.18</b>	<b>4.94</b>

**m) Number of puppies according to breed and parity**

Logistic regression with dependent variable: status (death vs alive) and as independent variables: breed (5 breeds) and type of insemination (TCI, AI IV or natural).

Observed data:

Breed	Parity	Deaths	Alive
NF	Primipare	21	229
NF	Pluripare	27	119
OEM	Primipare	7	150
OEM	Pluripare	7	62
EB	Primipare	34	237
EB	Pluripare	22	94
GD	Primipare	8	172
GD	Pluripare	8	104
DB	Primipare	14	174
DB	Pluripare	36	203

**A. Complete model with interaction**

Breed effect: **p = 0.0001997**

Insemination effect: **p= 1.068<sup>e</sup>-05**

No interaction: p= 0.8679918

**B. Modèle complet sans interaction :**

Breed effect: **p = 0.0001997**

Insemination effect: **p= 1.068<sup>e</sup>-05**

**C. Comparison of the two models:** Probability: 0.868 => Not one model better than the other.

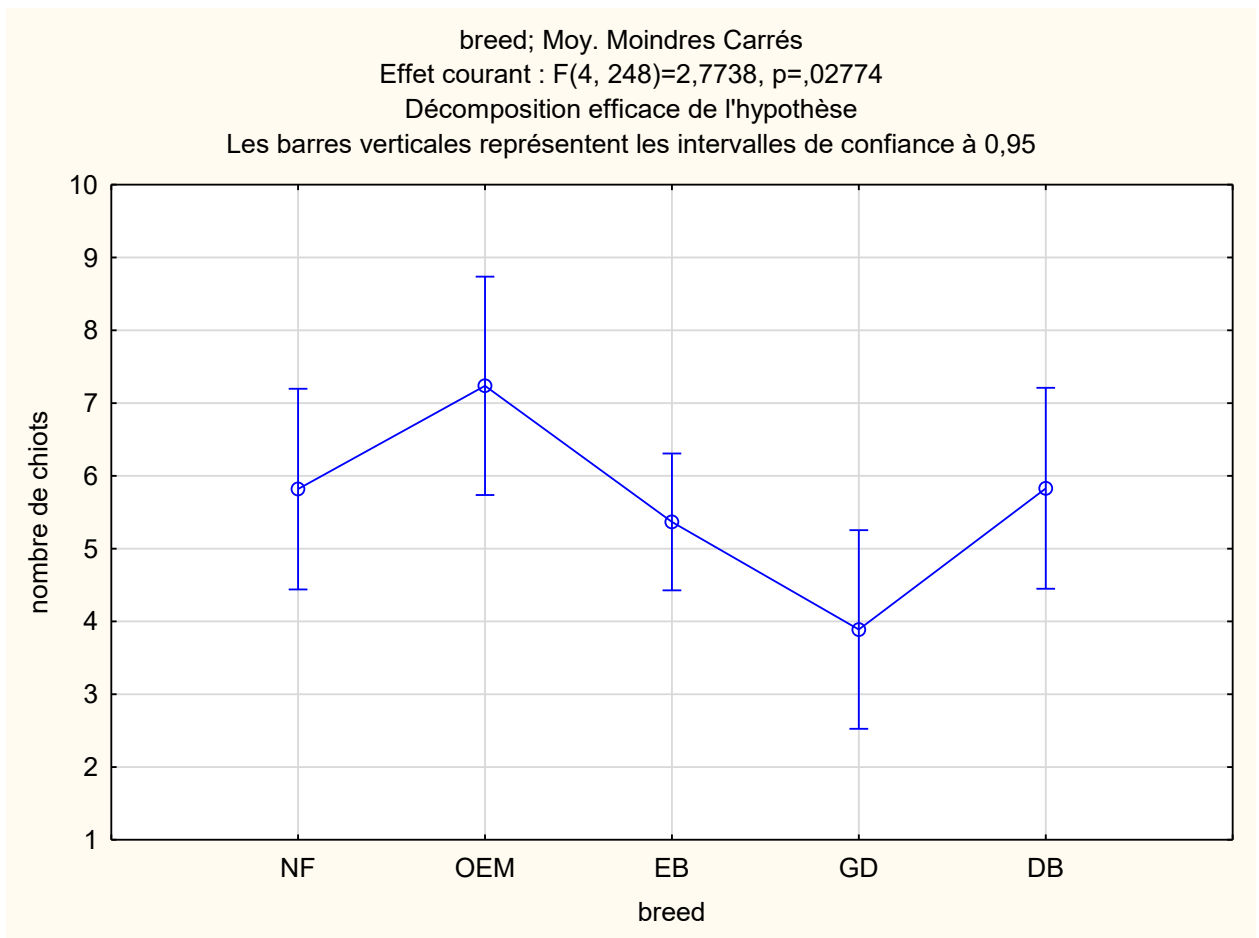
Odds ratio calculated as the alive/ dead ratio

If 1 is not part of the confidence interval => odds ratio is significant

<b>Comparaison</b>	<b>Odds-ratio</b>	<b>IC 2.5%</b>	<b>IC 97.5%</b>
Prim vs Pluri	<b>2.04</b>	<b>1.48</b>	<b>2.80</b>

<b>Comparaison</b>	<b>Odds-ratio</b>	<b>IC 2.5%</b>	<b>IC 97.5%</b>
NF vs OEM	<b>0.499</b>	<b>0.26</b>	<b>0.91</b>
NF vs EB	1.30	0.85	1.97
NF vs GD	<b>0.41</b>	<b>0.22</b>	<b>0.73</b>
NF vs DB	0.84	0.54	1.29
OEM vs EB	<b>2.6</b>	<b>1.45</b>	<b>4.97</b>
OEM vs GD	0.83	0.39	1.76
OEM vs DB	1.68	0.92	3.24
EB vs GD	<b>0.32</b>	<b>0.17</b>	<b>0.56</b>
EB vs DB	<b>0.65</b>	<b>0.42</b>	<b>0.98</b>
GD vs DB	<b>2.03</b>	<b>1.15</b>	<b>3.77</b>

**n) Effect of the breed in relation to the number of puppies**



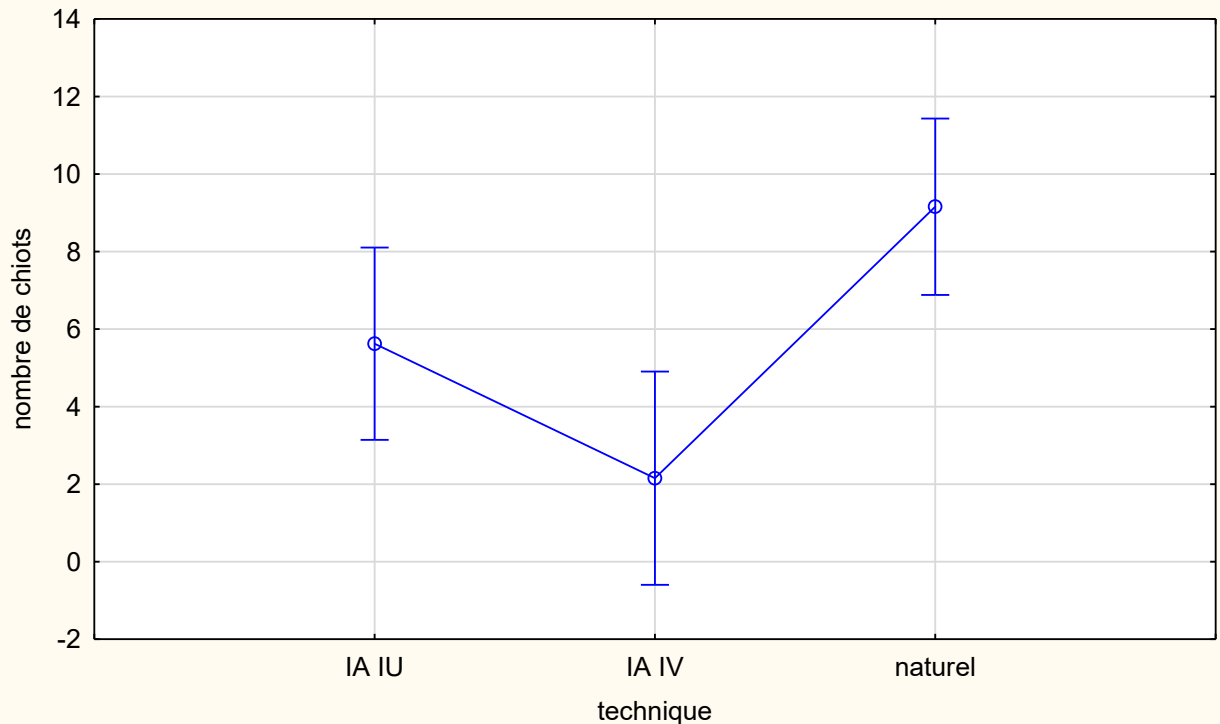
OEM > GD       $F(1, 248) = 10.57, p < .001$

DB > GD       $F(1, 248) = 3.87, p = .05$

NF > GD       $F(1, 248) = 3.84, p = .05$

EB > GD       $F(1, 248) = 3.08, p = .08$

technique; Moy. Moindres Carrés  
 Effet courant :  $F(2, 45)=7,9061, p=,00114$   
 Décomposition efficace de l'hypothèse  
 Les barres verticales représentent les intervalles de confiance à 0.95  
 Obs. incluses : 169:216



#### 4. DISCUSSION

In our population, there was no significant relation between parity and breeds when all breeds were considered together. All animals are breeding bitches from professional or semi-professional kennels. In all breeds, most of the breeders tend to limit the use of bitches until a reasonable age as fertility has been shown to decrease from year 5 on (Andersen and Simpson 1973, Gavrilovic et al. 2008). It is therefore not surprising that a good proportion of the bitches included in this study would be young animals and that primiparous bitches are significantly represented regardless the breed. It is important to bear in mind that the primiparous vs pluriparous status does not exclude history of infertility in any of the two categories as primiparous animals may have previously

unsuccessfully being bred. While most bitches included in this study had a history of infertility, no selection based on age was made.

In this study, there were more natural covers in great danes as compared to other breeds. English bulldogs and Old English Mastiffs in particular had significantly less natural breeding. Their anatomical features may account for a certain lack of aptitude for natural mounting (Pedersen et al. 2016). Some breeders also complain that specific breeds show reduced libido, which has been reported to be associated with decreased testosterone levels (Quadri and Palazzolo 1991), thus increasing AI use. However, while these elements may partially explain our observation, it is important to remember that AI is also used for assisted reproductive technologies in order to treat certain causes of infertility. The bias in our bitches population referred for infertility forces caution when trying to interpret this result.

In our study, there are significantly more positive pregnancy diagnoses in both primiparous and multiparous bitches in all breeds but in the great danes. This suggests a reduced fertility in that breed. As already mentioned, we also observed more natural breeding in that breed. This may be indicative special veterinary care associated with AI may improve fertility in the other breeds. More extensive use of AI in great danes should be tested to confirm that specific AI-related management accounts for the difference in fertility observed in comparison to the other breeds. In fact, if we consider the number of puppies in comparison whit the tecnicos of insemination, there is not effect for all of the breed, but the Great Dane. In that breed, it seems that natual breeding is more efficient that the Artificial Insemination and in that breed, the TCI is more efficient than AI IV. If we want try to explain that particular result, we need to consider the degree of managed matings. In fact, the bitches choise for natural breeding was from every point of view, “good for reproduction” and the only breeding menagement was the

monitoring of the estrus cycle and to find the fertile window, best time to conceive. For the bitches, in which the artificial insemination was used, in fact the bitches (or the male) had reduced reproductive ability.

A significant effect of the breed on the type of delivery (natural whelping vs caesarean section) was demonstrated. There were significantly more caesarean sections than natural births in English Bulldogs and Old English Mastiffs. Conversely, there were more natural deliveries in Newfoundland and Dogues de Bordeaux and no difference in Great Danes. Due to their anatomical characteristics that were already mentioned, elective surgeries are common practice in English Bulldogs and Old English Mastiffs for which caesarean sections frequency over 80% has been reported (Evans and Adams 2010). While both physical blockage and uterine inertia have been documented as frequent a cause for caesarean sections in these breeds (Evans and Adams 2010), obstructive causes may be encountered more often in bulldogs. In mastiffs, it is not uncommon that secondary uterine inertia appears after delivery of the first few pups, forcing the veterinary surgeon to operate in emergency on an exhausted mother to salvage the rest of the litter. Because caesarean sections prevent the risks associated with vaginal delivery and because of economic reasons as the cost-benefit balance even in case of avoiding the loss of just one puppy, elective caesarean sections are routinely performed on all English Bulldogs and mastiffs in our practice. This ensures optimal conditions reducing the risk for the litter, the stress for the mother-to-be, the practitioner and the owner. From an ethical point of view, systematic elective caesarean sections, on all breeds indifferently is questionable. The economics and the comfort of the breeder and the surgeon prevailing on the animal welfare as unnecessary surgeries are being performed, considering only 10% of all parturitions will actually require surgical intervention. Selection has led genetic diversity pauperization (Pedersen et al. 2016)

and to phenotypes that are nowadays poorly compatible with natural delivery. For animal welfare reasons, and because they do not present the same anatomical disorders and parturition problems, elective caesarean sections are not routine in our practice for the other breeds in this study. However, even in these breeds planned caesarean sections are part of the global breeding management. Reasons to consider elective caesarean sections in non-dystocia prone breeds include: too small litters of one or two pups, too large litters (>9) where uterine exhaustion is likely to occur before delivery is complete, malformation of the birth canal, feto-maternal disproportion (Linde Fosberg 2001). Logically, an overall relation between the breed and the urgent vs planned caesarean sections was observed in our population. When looking at the distribution per breed, the 100% planned surgeries in English Bulldogs and mastiffs naturally translated as statistically significant, while there were no differences between the two types of surgery for the other 3 breeds. This can be explained by the reason mentioned above, as a decision for a planned caesarean section in breeds without specific risk for dystocia is a medical one: the indicators for such a decision remaining the same regardless the breed. It is therefore not surprising that no statistical difference in that distribution could be observed.

Overall, number of natural deliveries for primiparous and pluriparous females was not statistically different in any of the breeds of this study. Dystocia have been reported to be more prevalent in primiparous as opposed to pluriparous bitches (Max and Jurka 2013). In our study, however primiparous bitches were not less likely to give birth naturally than multiparous bitches. The discrepancy may be attributed to the difference in breed as the study of 2013 was conducted on miniature breeds with a global conformation highly different than that of the large breeds in the present work. In another study investigating the causes for dystocia, age in relation to the primiparous status was

shown to impact the risk to have special obstetric conditions (Munnich and Kuchenmeister 2009). This may appear contradictory to our observation but the age range in our studied groups was rather narrow (2 to 6 years of age) and it may be suspected that this limited the effect of age and parity. Overall, number of caesarean sections for primiparous and pluriparous females, was not affected of the breeds of this study. As expected, because of the all caesarean sections policy on bulldogs and mastiffs, results for these two breeds should not be considered as they only reflect the original distribution of primiparous vs pluriparous animals within the initial population. However, Newfoundland primiparous had more caesarean sections than pluriparous bitches, which remains hard to explain.

The logistic regression showed that there was an effect of the breed and the type of insemination on the numbers of live and dead puppies. As would be expected, the odd ratio of having live vs dead puppies is not significant between IVAI and natural breeding. IVAI technique is reputed similar to natural breeding when it comes to fertility parameters (Farstad W. 1984). More surprisingly, TCI is associated with significant odd ratio for both IVAI and natural breeding. This means that chances to have live vs dead puppies are significantly higher with TCI than with these two other breeding techniques. This is rather difficult to explain but it is worth remembering that bitches selected for TCI are referred for infertility. Specific management of these problem bitches and special veterinary attention during pregnancy and parturition may partially account for this result.

Except for the Newfoundland, where no statistical difference was observed, the outcome of the litter was significantly poorer for the English Bulldog in comparison to the other breeds. Congenital abnormalities are particularly common in bulldogs (Fleming et al. 2011). These malformations sometimes lead to stillbirth but very often puppies are born

alive but their deformities require euthanasia thus impacting the odd ratio as calculated in the present work. There are few reports on litter outcomes available in the literature but a large scale study on perinatal mortality in 224 breeds (Tonnessen et al. 2012) broadly corroborates our observations. However, in that study databanks from the Norwegian Kennel Club were analyzed retrospectively and comparison of the figures they produce with our results is sometimes difficult due to this difference in methodology.

The outcome of Newfoundland puppies is significantly poorer than that of Old English Mastiffs and Great Danes and is similar to that of bulldogs, which has just been shown to be the worst, and of Dogues de Bordeaux. It can be speculated that in that particular breed elective caesarean section might be a solution to improve the outcome for the puppies. Further research along that line could greatly benefit to the veterinary surgeons and the breeders.

The outcome of Dogues de Bordeaux puppies is significantly poorer than that of the Great Danes and the mastiffs and similar to that of the Newfoundland. The overall poor outcome of puppies in that breed may be explained by the large body size and massive head, a common feature of all brachycephalic dogs that increases the risk of uterine inertia related dystocia, the high mean litter size as previously reported (Tonnessen et al. 2012).

In our study, the outcome for the puppies is significantly better for litters from primiparous vs pluriparous mothers. In general, breeders tend to be much more careful when a first-time mother to be is nearing her time and management is consequently improved. Medical decisions are also made more quickly, possibly improving the final outcome of the delivery.

The lack of data available in the literature on such an important subject shows how much scientific attention needs to focus on breeding management in order to build up evidence-based medicine and provide adequate advice to the breeders and the veterinary surgeons. The rare information that is available is based on retrospective studies analyzing big databanks where information is sometimes parcelar or simply lacking, making comparisons with other reports very difficult and final conclusions difficult to reach.

The revealed low fertility, unusually small litter size, or reduced sexual capacities in some bloodlines is probably explained by the current selection based on the beauty but correlated with a reduced reproductive capacity. In nature, the selection in the canine population eliminates the weaker or sexually inept animals. We regularly replenish nature contractions through the use of more and more efficient reproductive techniques, perpetuating artificial reproduction of dogs that, under natural conditions, could never contribute to the genetic pool. Another big problem in terms of fertility is the very small genetic pool caused by that very strong selection, using only very few blood-lines to create the new dog generation.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Amann R.P., Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Morrow DA, ed. Current Therapy in Theriogenology 2nd edition. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1986; 532-538.
- Andersen A, Simpson M. 1973. The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle). Eds Geron-X, Inc., Los Altos, California, U.S.A., 1973.
- Andersen K., Insemination of frozen dog semen based on a new insemination technique, Zuchthygiene 1975;10:1-4.

- Andersen A.; Simpson M., 1973: The genital system in maturity and senescence. In: L. Altos, (ed), Ovarian reproductive cycle of the dog. California USA, pp. 202-203.
- 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
- Barone R. (2003): “Feto e i suoi annessi”, in “Anatomia comparata degli animali domestici”, Vol.4 “Splancnologia, apparecchio urogenitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale”, Edagricole, Bologna.
- Batallier F., Vidament M., Fauquant J., Duchamp G., Arnaud G., Yvon J.M., Magistrini M., Advance in cooled semen technology, *nim Reprod Sci* 2001;68:181–190.
- Beccaglia M., Faustini M., Luvoni GC. (2008): “ Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vescicle for the determination of gestational age of the canine foetus”, *Reproduction in Domestestic Animals*, 43:367-370
- Belluzzi S., Garnum F., Soatti A., Fecondazione artificiale del cane con seme congelato. Artificial insemination in the dog with frozen semen. *Atti SISVet* 1988; Vol. 42:183.
- Bobic B., Gavrilovic, Andersson K., Linde Forsberg C., Reproductive patterns in the domestic dog—A retrospective study of the Drever breed, *Theriogenology* 70 (2008) pp. 783–794.
- Bogliolo L., Zedda M.T., Ledda S., Leoni G., Naitana S., Pau S., Influence of co-culture with oviductal epithelial cells on in vitro matuartion of canine oocytes, *Reprod Nutr Dev* 2002;42:265-273.
- Bolamba D., Russ K.D., Harper S.A., Sandler J.L., Durrant B.S., Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear maturation of dog oocytes in vitro. *Theriogenology* 2006;65(6):1037-1047.

- Bolamba D., Russ K.D., Olson M.A., Sandler J.L., Durrant B.S. In vitro maturation of bitch oocytes from advanced preantral follicles in synthetic oviduct fluid medium: serum is not essential. *Theriogenology* 2002; 58:1689-1703.
- Bouchard G.F., Morris J.K., Sikes J.D., Youngquist R.S., Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. *Theriogenology* 1990; 34:147–157.
- Brackett B.G., A review of in vitro fertilization. *Theriogenology* 1983; 19:1-15.
- Brackett B.G., Mastroianni L., Composition of oviductal fluid. In: The oviduct and its functions. Johnson AD, Foley CW (eds.), New York: Academic Press; 1974:133-159.
- Branam J.E., Keen C.L., Ling G.V., et Al. Selected physical and chemical characteristics of prostatic fluid collected by ejaculation from healthy dogs and from dogs with bacterial prostatitis, *Am J Vet Res* 1984; 45(4):825-9.
- Cardoso R.C.S., Silva A.R., Da Silva L.D.M., Comparison of two dilution rates on canine semen quality after cryopreservation in a coconut water extender. *Anim Reprod Sci* 2006; 92:384–391.
- Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Da Silva LDM. Cryopreservation of canine semen with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology* 2003; 59:743-751.
- Concannon PW, Hansel W, MCentee K., Changes in LH, progesterone and sexual behaviour associated with pre-ovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* 1977; 17:604-613.
- Cui XS, Jin YX, Shen XH, Lee JY, Lee HS, Yin XJ, Kong IK, Kim NH., Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology* 2006; 66:267-274.

- Das K, Stout LE, Hensleigh HC, Tagatz GE, Phipps WR, Leung BS. Direct positive effect of epidermal growth factor on the cytoplasmic maturation of mouse and human oocytes. *Fertil Steril* 1991; 55(5): 1000-1004.
- De Gier J, Kooistra S, Djajadiningrat-Laanen S, Dieleman S, Okkens A. 2006. Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17beta, progesterone, prolactin, and alpha-melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory, and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* 65:1346-1359.
- De Los Reyes M, De Lange J, Miranda P, Palominos J, Barros C., Effect of human chorionic gonadotrophin supplementation during different culture periods on in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005; 64:1-11.
- Daok R, Hall A, Dale H. 1967. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J.Reprod.Fertil.* 13(1):51-58.
- Dobrinsky I, Lulai C, Barth AD, Post K., Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:291–296.
- Driancourt M-A, Gougeon A, Monniaux D, Royère D, Thibault C. 2001, Folliculogenèse et ovulation. In *La reproduction chez les mammifères et l'Homme*. Ed Ch Thibault, M.C.Levasseur, pp 316-347. Ellipses editions marketing, Paris.
- England G, Verstegen J, Hewitt D. 2001, Pregnancy following in vitro fertilisation of canine oocytes. *Vet.Rec.* 148(1):20-22.
- England G, Yeager A. 1993, Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47:107-117.
- England G.C.W.; Millar K.M., The Ethics and Role of AI with Fresh and Frozen Semen in Dogs, *Reproduction in Domestic Animals*, 43(2), pp. 165–171.

- England GCW, Verstegen JP, Hewitt DA. Pregnancy following in vitro fertilization of canine oocytes. *Vet Rec* 2001; 148:20-22.
- 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.
- Evans K.M.; Adams V.J., Proportion of litters of purebred dogs born by caesarean section, *Journal of small animal practice*, 2010 Feb, pp. 113–118.
- Farstad W. Assisted reproductive technology in canid species. *Theriogenology* 2000; 53:175-186.
- Faber JJ., Thornburg KL. (1983): “Placental physiology. Structure and function of fetomaternal exchange”, Raven Press, New York, 1983.
- Farstad W.; 1984: Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen. *JSAP* 25, 9 pp 561–565
- Fleming J. M.; Creevy K. E.; Promislow D. E., 2011: Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of veterinary internal medicine*, 25 187-198.
- Fontbonne A, Rault D, Malandain E, Boschiero S, Truelle N, Dumasy M, et Al. 2004 Ovulation diagnosis attempt using ovarian ultrasonography. In: *Proceedings of the Fourth EVSSAR congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction*; 2004. p. 153–5.
- Forbeg CL. (2013):“Diagnosi di gravidanza, gravidanza e parto fisiologico nella cagna”, in England GCW. and Von Heimendahal 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.

- Fugger EF, Black SH, Keyvanfar K, Schulman JD., Birth of normal daughters after Micro sort sperm separation and intrauterine insemination, in-vitro fertilization, or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1998;13:2367-2370.
- Fujii M, Otoi T, Murakami M, Tanaka M, Une S, Suzuki T. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci* 2000;62(3):305-307.
- Gavrilovic B. B.; Andersson K.; Linde Forsberg C., 2008: Reproductive patterns in the domestic dog--a retrospective study of the Drever breed. *Theriogenology*, 70 783-794.
- Goodrowe KL, Hay MA, Platz CC, Behrns SK, Jones MH, Waddell WT. Characteristics of fresh and frozen thawed red wolf (*Canis rufus*) spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 1998;53:299–308.
- Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology* 1990;33:77-87.
- Hase, M, Hori, T, Kawakami, E, and TSUTSUI T. , T. 2000. Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J.Vet.Med.Sci.* 62(3):243-248.
- Hay MA, King WA, Gartley CJ, Goodrowe KL. 1994. Influence of spermatozoa on in vitro nuclear maturation of canine ova. *Biol. Reprod. Suppl.* 50:145.
- Hayer, P, Gunzel-Apel, AR, Luerssen, D, and Hoppen, HO. 1993. Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 47:93-100.
- Hesser A., Darr C., Gonzales K., Power H., Scanlan T., Thompson J., LOVE C., B. Christensen, Meyers S., Semen evaluation and fertility assessment in a purebred dog breeding facility, *Theriogenology*, 87 (2017) pp. 115–123.

- Hewitt DA, England GC. 1997. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51:83-91.
- Hewitt DA, England GCW. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. *J Reprod Fertil Suppl* 1997;51:83-91.
- Hewitt DA, England GCW. Influence of gonadotrophin supplementation on the in vitro maturation of bitch oocytes. *Vet Rec* 1999b;144:237-239.
- Hewitt DA, England GCW. The canine oocyte penetration assay; its use as an indicator of dog spermatozoal performance in vitro. *Anim Reprod Sci* 1997;50:123-139.
- Hewitt DA, Watson PF, England GCW. Nuclear staining and culture requirements for in vitro maturation of domestic bitch oocytes. *Theriogenology* 1998;49:1083-1101.
- Hewitt DA; England GCW. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell co-culture for canine oocyte maturation in vitro. *Anim Reprod Sci* 1999a;55:63-75.
- Hori T, Hagiuda K, Kawakami E, TSUTSUI T. i T. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluidsensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 2005;63:1573–1583.
- Hotston Moore A and England G (2008) Rigid endoscopy: urethrocystoscopy and vaginoscopy. In: *BSAVA Manual of Canine and Feline Endoscopy and Endosurgery*, ed. P Lhermette and D Sobel, pp. 142–157. BSAVA Publications, Gloucester.
- Howard JG, Barone MA, Donoghue AM, Wildt DE. The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *J Reprod Fertil* 1992;96:175–186.
- Infantosi Vannucchi C, Motos de Oliveira C, Groke Marques M, Ortiz Avila Assumpcao ME, Visintin JA. In vitro canine oocyte nuclear maturation in homologous oviductal cell co-culture with hormone-supplemented media. *Theriogenology* 2006;66:1677-1681.

- Johnson CA, Walker RD. Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *Compend Cont Educ Pract Vet* 1992; 14:763-772.
- Johnson LA, Pinkel D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry* 1986;7:268–273.
- Johnson LA. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci* 2000;60-61:93–107.
- Johnston SD, Root Kustritz MV and Olson PNS (2001) *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia.
- Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS. Disorders of the canine testes and epididymes. In: Johnston SD, Root Kustritz MV, Olson PNS, eds. *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: WB Saunders, 2001; 312-332.
- Johnston SD. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1991; 21:545-51.
- Kim MK, Fibrianto YH, Oh HJ, Jang G, Kim HJ, Lee KS, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Effects of estradiol-17 $\beta$  and progesterone supplementation on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:1342-1353.
- Kim YJ, Kim BJ, You I. Embryo transfer with frozen embryos in the dog. *J Vet Clin* 2002;19:73-79.
- Kim YJ, Kim HN, Han YM, Kim SJ, Kim BJ, Park YJ, Oh HG. Parentage testing for the offspring produced by embryo transfer with frozen embryos in the dog. *Korean J Vet Clin Med* 2000;17:234-237.
- Kinney GM, Pennycook JW, Schriver MD, Templeton JW, Kramer DC. Surgical collection and transfer of canine embryos. *Biol Reprod* 1979 Suppl;20:96.
- Kraemer DC, Flow BL, Schriver MD, Kinney GM, Pennycook JW. Embryo transfer in the nonhuman primate, feline and canine. *Theriogenology* 1979;11:51-62. 88.

- Kruip TAM, den Daas JHG. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology* 1997;47:43-52.
- Linde Forsberg C. 2001 Intra-Uterine Insemination in the Dog Using the Scandinavian Trans-Cervical Catheter and a Comparison with other Methods. <http://www.ivis.org>
- Lopate C, Threlfall WR , Rosol TI. Histopathologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology* 1989; 32:585-602.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Factors involves in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology* 2005;63:41-59.
- Luvoni GC, Chigioni S, Allievi E, Macis D. Meiosis resumption of canine oocytes cultured in the isolated oviduct. *Reprod Domest Anim* 2003;38:410-414.
- Luvoni GC, Chigioni S, Beccaglia M. Embryo production in dogs: from in vitro fertilization to cloning. *Reprod Dom Anim* 2006;41:286-290.
- Luvoni GC, Luciano AM, Modina S, Gandolfi F. Influence of different stages of the estrous cycle on cumulus-oocytes communications in canine oocytes: effects on the efficiency of in vitro maturation. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57:141-146.
- Maffeo G., Galli A., (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.
- Marquez-Black G, Ling GV, Nyland TG, et al. Prevalence of prostatic cysts in adult, large-breed dogs. *J Am Anim. Hosp Assoc* 1998; 34:177-180.
- Marseloo N., Fontbonne A., Bassu G., Rivière S., Leblanc B., Rault D., Biourge V, Chastant-Maillard S. 2004. Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in bitches. In: Abstracts Book. 5th

International Symposium on Canine and Feline Reproduction "Basic and Applied Research and Endangered Carnivores" (p. 75-77).

Max A.; Jurka P., 2013: Effectiveness of obstetric procedures in miniature dogs Bull Vet Inst Pulawy, 57 419-423.

Meyers-Wallen VN. Inherited Abnormalities of Sexual Development in Dogs and Cats In: Concannon PW, England G., Verstegen III J, et al, eds. Recent Advances in Small Animal Reproduction, International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org).

Munnich A.; Kuchenmeister U., 2009: Dystocia in numbers - evidence-based parameters for intervention in the dog: causes for dystocia and treatment recommendations. Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene, 44 Suppl 2 141-147.

Nizanski W, Dubiel A, Bielas W, Dejneka GJ. Effects of three cryopreservation methods and two semen extenders on the quality of dog semen after thawing. J Reprod Fertil Suppl 2001;57:365–369.

Nizański W. (2005) Comparisons of results of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with frozen–thawed semen. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 8, 4, pp.6 (<http://www.ejpau.media.pl/volume8/issue4/art-12.html>).

Nizański W. (2006) Intravaginal insemination of bitches with fresh and frozen-thawed semen with addition of of prostatic fluid: use of an infusion pipette and the Osiris catheter, Theriogenology 66, 470-483.

Nizański W., Klimowicz M., Partyka A., Savić M. & Dubiel A. (2009) Effects of the inclusion of Equex STM into Tris-based extender on the motility of dog spermatozoa incubated at 5 degrees C. Reprod. Domest. Anim. 44 (Suppl. 2) 363-365.

Nöthling JO, Gerstenberg C, Volkmann DH. Semen quality after thawing: correlation with fertility and fresh semen quality in dogs. J Reprod Fertil Suppl 1997;51:109–116.

- Nöthling JO, Shuttleworth R. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology* 2005;63:1469–1480.
- Oetl E.E. (1993) Sperm morphology and fertility in dog. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 47, 257-260.
- Oh HJ, Fibrianto YH, Kim MK, Jang G, Hossein MS, Kim HJ, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Effects of canine serum collected from dogs at different estrous cycle stages on in vitro nuclear maturation of canine oocytes. *Zygote* 2005;13(3):227-232.
- Okano T, Murase T, Asano M, Tsubota T. Effects of final dilution rate, sperm concentration and times for cooling and glycerol equilibration on post-thaw characteristics of canine spermatozoa. *J Vet Med Sci* 2004;66:1359–1364.
- Okkens, AC and Kooistra, HS. 2006. Anoestrus in the dog: a fascinating story. *Reprod.Domest.Anim* 41(4):291-296.
- Olar TT, Amann RP, Pickett BW. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biol Reprod* 1983; 29:1114-20.
- Olsen P.N. & Husted P.W. (1986) Breeding management for optimal reproductive efficiency in the bitch and stud dog. In *Current therapy in theriogenology*. 2nd edition, Morrow D.A. (ed), W.B. Saunders Comp., ISBN 978-0721665801, Philadelphia, 563-466.
- Ombelet W. e Van Robays J., Artificial insemination history: hurdles and milestones, *Facts Views Vis Obygn* 2015.
- Otoi T, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Suzuki T. Effect of serum on the in vitro maturation of canine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 1999;11:387-390.
- Otoi T, Murakami M, Fujii M, Tanaka M, Ooka A, Une S, Suzuki T. Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro. *Vet Rec* 2000;146:52-53.
- Otoi T, Shimizu R, Naoi P, Wongsrikeao B, Agung B, Taniguchi M. Meiotic competence of canine oocytes embedded in collagen gel. *Repro Dom Anim* 2006;41:17-21.

- Otoi T, Shin T, Kraemer D, Westhusin ME. Influence of maturation culture period on the development of canine oocytes after in vitro maturation and fertilization. *Reprod Nutr Dev* 2004;44:631-637.
- Otoi T, Willingham L, Shin T, Kraemer DC, Westusin M. Effects of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocytes. *Reproduction* 2002;124:775-781.
- Pardo-Carmona B., Moyano M.R., Fernández-Palacios R. & Pérez-Marín C.C. (2010) Saliva crystallisation as a means of determining optimal mating time in bitches. *J Small Anim Pract.* 51, 437-42.
- Payan-Carreira R., Miranda S. e Nizanski W., Artificial Insemination in Dogs, Artificial Insemination in Farm Animals, Miulad Manafi (Ed.), In Tech, <http://www.intechopen.com/books/artificialinsemination-in-farm-animals/artificialinseminatio-in-dogs>.
- Pedersen N.C., Pooch A.S. e Liu H., A genetic assessment of the English Bulldog, *Canine Genetics and Epidemiology* (2016), pp. 1–16.
- Peña A.I., Johannisson A., & Linde-Forsberg C. (2001) Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl.* 57, 371-376.
- Peña A.I., Quintela L.A., & Herradón P.G. (1998) Viability assessment of dog spermatozoa using flow cytometry. *Theriogenology* 50, 1211-1220.
- Peña AI, Johannisson A, Linde Forsberg C. Validation of flow cytometry for assessment of viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa and for evaluation of different methods of cryopreservation. *J Reprod Fertil Suppl* 2001;57:371–376.
- Peña AI, Johannisson A, Linde-Forsberg C. Post-thaw evaluation of dog spermatozoa using a new triple fluorescent staining and flow cytometry. *Theriogenology* 1999;52:965–980.

- Phemister RD, Holst PA, Spano JS, Hopwood ML. 1973. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* 8:74-82.
- Phemister, RD, Holst, PA, Spano, JS, and Hopwood, ML. 1973. Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol.Reprod.* 8(1):74-82.
- Pineda M.H., Kainer R.A. & Faulkner L.C. (1973) Dorsal median postcervical fold in the canine vagina. *Am. J. Vet. Res.* 34, 1487-1491.
- Pinto C.R., Eilts B.E. & Paccamonti D.L. (1998) The effect of reducing hindquarter elevation time after artificial insemination in bitches. *Theriogenology.* 50, 301-5.
- Quadri S.; Palazzolo D., 1991: How aging affects the canine endocrine system. *Vet Med*, 86 692-706.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D. & de Kruif A. (2003) Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer. *Theriogenology.* 60, 1553-1568.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Tanghe S., Coryn M., Maes D. & de Kruif A. (2005) New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology* 64, 706-719.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Van Cruchten S., Coryn M., Görtz K., Maes D. & de Kruif A. (2004) Sperm distribution in the genital tract of the bitch following artificial insemination in relation to the time of ovulation. *Reproduction* 128, 801-11.
- Rodrigues BA, dos Santos LC, Rodrigues JL. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;67:215-223.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Embryonic development of in vitro matured and in vitro fertilized dog oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004;67:215-223.
- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology* 2003a;60:59-66.

- Rodrigues BA, Rodrigues JL. Meiotic response of in vitro matured canine oocytes under different proteins and heterologous supplementation. *Reprod Domest Anim* 2003b;38:58-62.
- Ronsse V, Verstegen J, Onclin K, et al. Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1). *Theriogenology* 2004; 61:619-36.
- Root Kustritz M.V. (2003) *Small animal theriogenology (The practical veterinarian)*. Butterworth-Heinemann, ISBN 978-0750674089, Oxford, UK.
- Rota A, Iguer Ouada M, Verstegen J, Linde Forsberg C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. *Theriogenology* 1999;51:1045–1058.
- Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 2006;65:1848–1858.
- Rota A, Rota A, Martini M, Milani M, Milani C, Romagnoli S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod Nutr Dev* 2005;45:29–37.
- Rota A., Iguer-Ouada M., Verstegen J. & Linde-Forberg C. (1999a) Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a TRIS extender with of without Equex STM Paste. *Theriogenology* 51, 1045-1058.
- Rota A., Peña A.I., Linde-Forsberg C. & Rodriguez-Martinez H. (1999b) In vitro capacitation of fresh, chilled and frozen-thawed dog spermatozoa assessed by the chlortetracycline assay and changes in motility patterns. *Anim Reprod Sci.* 57, 199-215.
- Ruel Y, Barthez PY, Mailles A, Begon D. Ultrasonographic evaluation of the prostate in healthy intact dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1998; 39(3):212-6.

- Saint-Dizier M, Renard JP, Chastant-Maillard S. Induction of final maturation by sperm penetration in canine oocytes. *Reproduction* 2001;121:97-105.
- Silva AR, Cardoso RC, Uchoa DC, Silva LD. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology* 2003
- Silva L.D.M., Onclin K., Lejeune B. & Verstegen J.P. (1996) Comparisons of intravaginal and intrauterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. *Vet. Rec.* 17, 154-157.
- Silva L.D.M., Onclin K., Snaps F. & Verstegen J. P. (1995) Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. *Theriogenology* 43, 615-623.
- Silva P.F. & Gadella B.M. (2006) Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958-978.
- Sirivaidyapong S., Cheng F.P., Marks A., Voorhout W.F., Bevers M.M. & Colenbrander B. (2000) Effect of sperm diluents on the acrosome reaction in canine sperm. *Theriogenology* 53, 789-802.
- Ström-Holst B., Larsson B., Rodriguez-Martinez H., Lagerstedt A.-S. & Linde-Forberg C. (2001). Zona pellucida binding assay- a method for evaluation of canine spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl* 57: 137-140.
- Sverdrup Borge K., Tonnessen R., Nodtvedt A., Indrebo A., Litter size at birth in purebred dogs—A retrospective study of 224 breeds, *Theriogenology* 75 (2011) pp. 911–919.
- Taha MB, Noakes DE, Allen WE. Some aspects of reproductive function in the male beagle at puberty. *J Small Anim Pract* 1981; 22:663-7.
- Taha MB, Noakes DE, Allen WE. The effect of season of the year on the characteristics and composition of dog semen. *J Small Anim Pract* 1981; 22:177-84.
- Thomassen R. & Farstad W. (2009) Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology*, 71, 190-199.

- Thomassen R., Sanson G., Krogenaes A., Fougner J.A., Andersen Berg K. & Farstad W. (2006) Artificial insemination with frozen semen in dogs: A retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. *Theriogenology* 66, 1645-1650.
- Tonnessen R.; Borge K. S.; Nodtvedt A.; Indrebo A., 2012: Canine perinatal mortality: a cohort study of 224 breeds. *Theriogenology*, 77 1788-1801.
- Tsutsui T.; Ejima H. 1988. Experimental induction of superfecundation in the dog. *Jpn J Vet Sci.* 50:581-583.
- Tsutsui T. ET SHIMIZU T. 1975. Studies on the reproduction of the dog. IV. On the fertile period of ovum after ovulation. *Jpn J Anim Reprod* 21:65-69.
- Tsutsui T., Hori T, Eendo S, Hayama A, Kawakami E. 2004. Intrauterine transplantation of the early canine embryos. *Proc. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Sao Paulo, 2004.* p271-273.
- Tsutsui T. T, Hori T, Endo S, Hayama A, Kawakami E. Intrauterine transfer of early canine embryos. *Theriogenology* 2006;66:1703-1705.
- Tsutsui T., Hori T, Kawakami E. Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 2001a;57:309-314.
- Tsutsui T., Hori T, Okazaki H, Tanaka A, Shiono M, Yokosuka M, Kawakami E. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci* 2001b;63:401-405.
- Tsutsui T., Shimada K, Nishi M, Kubo N, Murao I, Shimizu T, Ogasa A. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jap J Vet Sci* 1989;51:797-800.;59:821–829.
- Tsutsui T., Shimada K, Nishi M, Kubo N, Murao I, Shimizu T, Ogasa A. 1989. An experimental trial on embryo transfer in the dog. *Jpn J Vet Sci*;51:797-800.
- Tsutsui T., Tezuka T, Shimizu T, Murao I, Kawakami E, Ogasa A. Artificial insemination with fresh semen in beagle bitches. *Jpn J Vet Sci* 1988;50:193–198.

- Tsutsui T. (1989) Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl.* 39, 269-75.
- Tsutsui T. 1975a Studies on the reproduction in the dog. V. On cleavage and transport of fertilized ova in the oviduct. *Jpn J Anim Reprod.* 21:70-75.
- Tsutsui T. 1975 Ovulation rate and transuterine migration of the fertilized ova. *Jpn J Anim Reprod.* 21:98-101.
- Tsutsui T. 1989. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl* 39:269-275.
- Tsutsui T., Takahashi F., Hori T., Kawakami E. & Concannon P.W. (2009) Prolonged duration of fertility of dog ova. *Reprod Domest Anim.* 44 Suppl 2, 230-3.
- Tsutsui T., Hori, T., Kawakami, E. 2001a. Intratubal transplantation of early canine embryos. *J Reprod Fert. Suppl* 57:309-314.
- Tsutsui T., Hori, T., Okazaki, H., Tanaka, A., Shiono, M., Yokosuka, M., Kawakami, E. 2001b. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing. *J Vet Med Sci.* 63 :401-405.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. (2001) Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57, 149-179.
- von Heimendahl A. e England Gary C.W. Determinazione della fase del ciclo estrale, Moxon R., Copley D. & England G.C. (2010) Technical and financial evaluation of assays for progesterone in canine practice in the UK. *Vet Rec.* 167, 528-31.
- Wallace S.S., Mahaffey M.B., Miller D.M. Thompson F.N. & Chakraborty P.K. (1992) Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am J Vet Res* 53(2): 209-215.

- Wallace, SS, Mahaffey, MB, Miller, DM, Thompson, FN, and Chakraborty, PK. 1992. Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. *Am.J.Vet.Res.* 53(2):209-215.
- Watson P.F. (1975) Use of Giemsa stain to detect changes in acrosomes of frozen ram spermatozoa. *Vet. Rec.* 97, 12-15.
- Westhusin, M, Burghardt, R, Ruglia, J, Willingham, L, Liu, L, Shin, T, Howe, LM, and Kraemer, D. 2001. Potential for cloning dogs. *J.Reprod.Fertil.Suppl* 57:287-293.
- Westhusin, M, Hinrichs, K, Choi, YH, Shin, T, Liu, L, and Kraemer, D. 2003. Cloning companion animals (horses, cats, and dogs). *Cloning Stem Cells* 5(4):301-317.
- Wildt, DE, Chakraborty, PK, Panko, WB, and Seager, SW. 1978. Relationship of reproductive behavior, serum luteinizing hormone and time of ovulation in the bitch. *Biol.Reprod.* 18(4):561-570.
- Wildt, DE, Levinson, CJ, and Seager, SW. 1977. Laparoscopic exposure and sequential observation of the ovary of the cycling bitch. *Anat.Rec.* 189(3):443-449.
- Willingham-Rocky LA, Hinrichs K, Westhusin ME, Kraemer DC. Effect of stage of oestrous cycle and progesterone supplementation during culture on maturation of canine oocytes in vitro. *Reproduction* 2003;126:501-508.
- Wilson M.S. (1993) Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 47, 307-311.
- Wilson M.S. (2001) Transcervical insemination techniques in the bitch. *Vet. Clin. North. Am. (Small Anim. Pract.)* 31, 291-304.
- Wilson M.S., Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. *J Reprod Fertil Suppl* 1993;47:307-311.

- Yamada S., Shimazu Y., Kawaji H., Nakazawa M., Naito K., and Toyoda Y., (1992).  
Maturation, fertilization, and development of dog oocytes in vitro. *Biol.Reprod.*  
46(5):853-858.
- Yeager A.E. & Concannon P.W. (1996) Ovaries. In: *Small animal ultrasound*, Green RW  
(Ed.), Philadelphia: Lippincott Raven, 293-303.
- Yildiz C., Kaya A., Aksoy M., Tekeli T., Influence of sugar supplementation of the extender  
on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing.  
*Theriogenology* 2000;54:579–585.
- Zawistowski, S., Morris, J., Salman, M.D., Ruch-Gallie R.,. 1998. Population dynamics,  
overpopulation, and the welfare of companion animals: new insights on old and new  
data. *J Appl Anim Welf Sci.* 1:193-206.