



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico

in

MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**RELAZIONE TRA COMPOSIZIONE BIOCHIMICA DEL PLASMA SEMINALE E
QUALITÀ DEL SEME DI STALLONI TROTTATORI**

Relatore **Dott. CALOGERO STELLETTA**

Correlatori **Dott. SILVIA VALENTINI**

Dott. MARTIN ARGAÑARAZ

Laureanda **SILVIA ALBERTI**

Matricola n. 565047/MV

ANNO ACCADEMICO 2012-2013

Indice

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	2
PREMESSA	3
1. INTRODUZIONE	4
1.1. Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore maschile.....	4 4
1.2. Composizione biochimica del plasma seminale	5
1.2.1. Proteine	7
1.2.2 Aminoacidi ed enzimi.....	8
1.2.3. Antiossidanti	9
1.2.4. Ioni.....	9
1.2.5. Lipidi	9
1.3 Caratteristiche del plasma seminale equino.....	10
1.4 Valutazione qualità del seme.....	12
2. MATERIALI E METODI	13
2.1 Stalloni.....	13
2.2 Campionamento.....	14
2.3. Elettroforesi.....	15
2.4 Valutazione biochimica del plasma seminale.....	19
2.5 Valutazione qualità del seme	19
2.6 Analisi statistica	20
3. RISULTATI	21
3.1. Analisi elettroforetica	21
3.4 Valutazione del seme	28
3.4. Studio delle correlazioni.....	36
4. DISCUSSIONE	42
4.1 Valutazione proteica.....	42
4.2 Valutazione biochimica.....	44
4.3 Valutazione del seme	46
5. CONCLUSIONI	49
6. BIBLIOGRAFIA	50

RIASSUNTO

La composizione del plasma seminale nel cavallo non si discosta da quella di altri mammiferi domestici. In esso sono stati individuati aminoacidi e proteine, enzimi, ioni organici, lipidi ed acidi grassi, ormoni e zuccheri.

La scoperta e l'identificazione di più sostanze nella secrezione del plasma seminale da parte della rete testis, dell'epididimo e delle ghiandole accessorie, ha aperto la strada per studiare la diversità della funzione dei secreti e i loro possibili ruoli per gli spermatozoi.

Analogamente i progressi nelle tecnologie riproduttive hanno rivelato che il plasma seminale è un mezzo nutritivo e di protezione per gli spermatozoi in sospensione e che alcuni dei suoi componenti sono molto importanti per il metabolismo degli stessi, così come per la loro sopravvivenza e il trasporto nel tratto riproduttivo femminile.

La biochimica del plasma seminale è un campo relativamente moderno della ricerca, in particolare per quanto riguarda il significato biologico dei vari costituenti biochimici.

Negli ultimi vent'anni inoltre sono stati fatti una serie di studi elettroforetici per caratterizzare le proteine contenute nel plasma seminale e ricercarne le diverse funzioni. Lo scopo del nostro studio è stato quello di analizzare la composizione proteica, la composizione biochimica e alcuni parametri della qualità del seme degli eiaculati freschi di un campione di 7 stalloni appartenenti alla razza trottatori italiani, per valutare se ci fossero degli indici significativi di fertilità nella maggiore o minore concentrazione di alcune proteine e di alcuni elementi biochimici.

L'analisi dei dati raccolti attraverso elettroforesi monodimensionale ha verificato che la maggior presenza di proteine a basso peso molecolare è un indicatore significativo di bassa qualità del seme, mentre la maggior presenza di proteine ad alto peso molecolare è significativa di miglior qualità del seme.

Analogamente, l'analisi biochimica ha evidenziato alcuni elementi correlati, positivamente ed altri negativamente, con il successo nella fertilizzazione.

ABSTRACT

The composition of the seminal plasma in the horse does not differ from that of other domestic mammals. In it have been identified amino acids, proteins, enzymes, organic ions, lipids, fatty acids, hormones, and sugars.

The discovery and identification of several substances in the secretion of seminal plasma from the rete testis, epididymis and accessory glands, has opened the way to study the diversity of the function of secreted and their possible roles in sperm.

Similarly advances in reproductive technologies have revealed that the seminal plasma is a nutrient and protection medium for the sperm in suspension and that some of its components are very important for the metabolism of the same, as well as for their survival and transport in the stretch female reproductive tract.

The Biochemical of the seminal plasma is a relatively modern field of research, in particular as regards the biological significance of the various biochemical constituents.

In the last twenty years have also been made a series of studies electrophoretic to characterize the proteins contained in the seminal plasma and search for the different functions.

The aim of our study was to analyze the protein composition, biochemical composition and some parameters of semen quality of fresh ejaculates on samples of seven stallions belonging to the Italian race trotters to evaluate if there were significant indexes of fertility in greater or lesser concentration of some proteins and some biochemical elements.

The analysis of data collected through one-dimensional electrophoresis verified that the greater presence of low molecular weight proteins is a significant indicator of poor quality of the semen, while the greater presence of proteins of high molecular weight is significant higher quality of the semen.

Similarly, biochemical analysis has identified several elements related positively and others negatively, with the success in fertilization.

PREMESSA

Al fine di contestualizzare la presente Tesi, vengono trattate nell'introduzione le caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'apparato riproduttore dello stallone, la composizione del plasma seminale, le caratteristiche peculiari nello stallone e la metodica per la valutazione della qualità del seme.

1. INTRODUZIONE

1.1. Cenni di anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttore maschile

Il tratto genitale maschile può essere definito come un “complesso produttivo” che ha come prodotto primario lo spermatozoo. Gli ormoni, come il testosterone, il fluido epididimale ed il plasma seminale concorrono alla buona riuscita del processo produttivo. I testicoli hanno un'immensa capacità produttiva nei mammiferi (da < 1 a 25 miliardi di spermatozoi al giorno ovvero 35000 – 200000 al secondo) (Dyce K.M., 2006).

L'apparato genitale maschile è costituito da: scroto, testicoli, funicoli spermatici, vie spermatiche, ghiandole accessorie, uretra, pene, prepuzio e muscoli che concorrono all'erezione ed eiaculazione.

Lo scroto forma due tasche nella regione inguinale che contengono e proteggono i testicoli, gli epididimi, i cordoni spermatici ed i muscoli cremasteri. Esso interviene nel processo di termoregolazione (Varner D.D, 1991).

Lo stress da calore nello stallone può determinare cambiamenti della morfologia e motilità degli spermatozoi ed in un secondo tempo della cromatina (Love C.C., 1999).

I testicoli, accolti nella loggia testicolare dello scroto, oltre alla funzione gametogena (spermatogenesi), esplicano una funzione endocrina-paracrina-autocrina mediante la produzione di ormoni come il testosterone (Roser J.F., 2001).

Il funicolo spermatico, accolto nella tunica vaginale parietale, ha un'importante funzione termoregolatrice, indispensabile ai fini della spermatogenesi. Infatti, attraverso uno scambio controcorrente di calore, la temperatura del sangue si abbassa di 4-6° C prima di arrivare al testicolo (Barone R., 1994).

Le vie spermatiche si estendono dai testicoli al seno uro-genitale. Le sue funzioni, modulate dal testosterone e dagli estrogeni (Parleviet J.M., 2006), sono quelle di concentrare e rendere fertili gli spermatozoi (maturazione) (Aman R.P., 1993b).

L'eiaculato è composto oltre che dalle cellule spermatiche anche dal plasma seminale. Quest'ultimo è prodotto dall'epididimo e dalle ghiandole accessorie. Le ghiandole accessorie nello stallone includono le ampolle dei deferenti (ergotioneina, le ghiandole vescicolari (frazione gelatinosa del seme), la prostata (frazione ricca di spermatozoi) e le ghiandole bulbouretrali (frazione pre-spermatocidica). La loro attività è regolata dal testosterone in circolo (Chenier T.S., 2000).

1.2. Composizione biochimica del plasma seminale

La composizione biochimica del plasma seminale (PS) è molto complessa e variabile tra le specie. I progressi nelle tecnologie riproduttive rivelano che il PS è un mezzo nutritivo e di protezione per gli spermatozoi in sospensione. Alcuni componenti del PS sono molto importanti per il metabolismo degli spermatozoi, così come per la loro sopravvivenza e il trasporto nel tratto riproduttivo femminile. La biochimica del PS è un campo relativamente moderno della ricerca, in particolare per quanto riguarda il significato biologico dei vari costituenti biochimici del PS.

I componenti biochimici del PS sono secreti dalla rete testis, epididimo, e le ghiandole sessuali accessorie (AGS) del tratto riproduttivo maschile (Mann e Lutwak-Mann, 1981). Le GA, note come vescicole seminali, prostata, e ghiandole bulbouretrali, contribuiscono alla maggior parte del volume dell'eiaculato mentre la secrezione delle vescicole seminali costituisce la maggior parte del PS. In passato si riteneva che tutte le GA potessero essere anatomicamente e funzionalmente omogenee a causa della loro stessa origine embrionale e della loro simile struttura morfologica. La scoperta e l'identificazione di più sostanze nella secrezione delle GA, come acido citrico, fosfatasi prostatica, fruttosio e fosforilcolina (Mann, 1964), ha aperto la strada per studiare la diversità della funzione dei secreti delle diverse ghiandole e i loro possibili ruoli per gli spermatozoi. Il PS ha convenzionalmente il ruolo di mezzo di sopravvivenza che facilita il trasporto degli spermatozoi. Questo punto di vista è stato messo in discussione dalle nuove tecnologie di riproduzione con cui è possibile fertilizzare ovuli con spermatozoi lavati e produrre embrioni vitali con conseguente prole viva senza esposizione del PS nel tratto riproduttivo femminile. D'altra parte, è stato anche osservato che l'uso di sperma conservato per l'inseminazione artificiale

sulle specie di animali, che spesso comporta diluizione intensiva o rimozione del PS, si traduce in minor tassi di fertilità rispetto all'accoppiamento naturale (Tummaruk et al, 2000). Questo suggerisce che i componenti del PS partecipano a eventi chiave relativi alla funzione dello sperma, fecondazione e sviluppo dell'embrione nell'apparato riproduttivo femminile.

IL PS si compone di ioni (Na⁺, K⁺, Zn⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cl), substrati energetici (fruttosio, sorbitolo, glicerilfosfolina), composti organici (acido citrico, aminoacidi, peptidi, proteine di basso peso e ad alto peso molecolare, lipidi, ormoni, citochine). La composizione chimica e la funzione del secreto delle GA variano da specie a specie, fra i maschi all'interno di una specie, e anche tra eiaculati dello stesso maschio (Killian et al, 1993; Aurich et al, 1996).

La funzione del PS nella fisiologia normale è associata con l'eiaculazione degli spermatozoi e la loro successiva sopravvivenza nel tratto riproduttivo femminile. Il ruolo del PS sulla maturazione degli spermatozoi è stato ampiamente studiato con risultati contrastanti, e la ricerca in diverse specie ne evidenzia vari ruoli, tra cui:

- attivazione e aumento della motilità degli spermatozoi;
- mezzo per fornire l'ottimale osmosi e nutrimento;
- prevenzione di attivazione prematura durante il trasporto fisiologico degli spermatozoi e stabilizzazione della membrana plasmatica (PM) con inibitori della capacitazione (Desnoyers e Manjunath, 1992; Villemure et al, 2003);
- protezione degli spermatozoi da fagocitosi e distruzione nell'evento infiammatorio nel cavallo (Alghamdi et al, 2004);
- , regolamentazione del trasporto degli spermatozoi e loro eliminazione (Trosdsson et al, 2005);
- assistenza nelle interazioni sperma-ovulo (Souza et al, 2008);
- attivazione dell'espressione delle citochine embrionali e di aiuto attraverso la preparazione del tratto materno allo sviluppo dell'embrione, in particolare facilitando i cambiamenti immunitari necessari per accogliere la gravidanza (Robertson, 2005);
- influenza sulla fertilità (Rozeboom et al, 2000).

Inoltre, l'aggiunta di PS o dei suoi componenti nello sperma scongelato aumenta il consumo di ossigeno e la motilità degli spermatozoi (White et al,1987), aiuta a recuperare alcune proteine di superficie (Dominguez et al, 2008) e migliora la qualità di tutti i parametri dello sperma (Maxwell et al, 2007). Al contrario, sono stati segnalati anche gli effetti negativi del PS sulla motilità e vitalità degli spermatozoi dopo congelamento-scongelo (Garcia e Graham, 1987).

Il PS gioca anche un ruolo immunomodulante che è benefico per la sopravvivenza degli spermatozoi nel tratto riproduttivo femminile. Diversi fattori nel PS, comprese le proteine, citochine, ormoni sessuali, e le prostaglandine, accompagnano la migrazione degli spermatozoi al tratto riproduttivo femminile (Matousek, 1985) e possiedono la potenziale capacità biologica di proteggere gli spermatozoi da diversi patogeni, sia nel tratto riproduttivo maschile che femminile (Maegawa et al, 2002).

1.2.1. Proteine

Il PS contiene diverse proteine, molte delle quali sono prodotti di secrezione di epididimo e vescicole seminali (Chandonnet et al, 1990). L'aggiunta e la rimozione di un tipo di proteina dal PS durante la maturazione epididimale e l'ejaculazione svolgono un ruolo importante nel mantenimento della stabilità della MP (Desnoyers e Manjunath,1992), nella motilità (Henricks et al, 1998; Sánchez-Luengo et al, 2004), nella capacitazione (Therien et al, 1998), nell'interazione sperma-uovo e nella fecondazione (Yanagimachi,1994). È stato anche dimostrato che le proteine del PS possono migliorare la penetrazione degli spermatozoi negli ovociti (El-Hajj Ghaoui et al, 2007).

Le proteine del PS promuovono la fagocitosi e l'attacco degli spermatozoi morti, e anche l'attivazione delle cellule polimorfonucleate grazie all'attività proteasica (Dacheux et al, 2003).

Spermatozoi di mammifero acquisiscono la loro motilità e capacità di riconoscere e fecondare ovociti, da sequenziali interazioni con proteine presenti nel fluido epididimale. Le principali proteine dell'epididimo sono lattoferrina, clusterina, procatapsina D, e la proteina transfer del colesterolo. Varie proteine dell'epididimo hanno ruoli diversi sulla funzionalità degli spermatozoi, sia modificando la superficie della membrana degli spermatozoi o la composizione o contribuendo a preservare l'integrità degli stessi.

La ricerca con stalloni ha rivelato che le proteine dell'epididimo potrebbero alterare le caratteristiche della MP attraverso clusterina e colesterolo-binding protein o tramite attività enzimatiche di glicosidasi, glicosiltransferasi, proteasi, e inibitori della proteasi (Dacheux et al 2003).

1.2.2 Aminoacidi ed enzimi

Vi è un'ampia gamma di aminoacidi nel PS, e la maggior parte di questi è prodotta nei testicoli e nell' epididimo. La loro concentrazione aumenta dopo l'eiaculazione a causa della forte attività proteolitica che si svolge nel liquido seminale (Mann, 1964). Gli aminoacidi servono come substrato per le reazioni di ossidazione che danno energia agli spermatozoi. (Neumark e Schindler, 1967). L'aminoacido che si trova in maggior concentrazione nel PS è l'acido glutammico, che è accompagnato da un'elevata attività della transaminasi glutammico acetica (GOT). (Flipse, 1960). Altri enzimi del PS come il GOT, l'aspartato aminotransferasi (AST / AAT), il piruvato transaminasi glutammico (GPT), l'alanina aminotransferasi (ALT), la fosfatasi alcalina (AP), e il lattato deidrogenasi (LDH), sono utilizzati come buoni indicatori della qualità del seme perché misurano la stabilità della MP degli spermatozoi (Sirat et al, 1996). Si suppone che la possibile fonte di questi enzimi siano i testicoli e l'epididimo perché vi è un'evidente correlazione positiva con la concentrazione spermatica mentre è negativa rispetto al volume (Kareskoski e Katila, 2008), e la presenza delle attività enzimatiche seguono la stagionalità riproduttiva (Gundogun, 2006).

Le transaminasi sono localizzate principalmente nel collo (Mann e Lutwak- Mann, 1981), mentre LDH è localizzato nel citoplasma e nei mitocondri degli spermatozoi (Burgos et al, 1995).

L'attività della fosfatasi alcalina si osserva nella testa, nel collo, frammenti della coda, ed è nota la sua azione regolatrice della fosforilazione di proteine grazie a protein-chinasi cAMP dipendenti, necessaria per la motilità dello spermatozoo (Tang e Hoskins, 1975 Dhami e Kodagali 1990) Un enzima ubiquitario noto come fosfolipasi A2, capace di idrolizzare i lipidi in posizione sn-2 dei fosfolipidi, è stato rilevato in spermatozoi e PS di diverse specie (Upreti et al, 1999). Si ritiene che questo enzima

partecipi alla reazione acrosomiale e fusione spermatozoo-uovo. Il PS contiene anche enzimi che proteggono gli spermatozoi nel tratto riproduttivo femminile.

1.2.3. Antiossidanti

Gli spermatozoi sono molto sensibili alla perossidazione lipidica dei radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno (ROS), quali perossido di idrogeno (H_2O_2), anione superossido (O_2^-), ossido nitrico (NO), e radicale idrossile (2OH).

Per proteggere gli spermatozoi dallo stress ossidativo sia gli spermatozoi che il plasma seminale contengono enzimi antiossidanti conosciuti come dismutasi superossido (SOD), glutazione reduttasi (GR), glutazione perossidasi (GPx) e i suoi substrati (GSH e GSSG), e catalasi (CAT).

Sorprendentemente il PS ha un contenuto di antiossidanti molto maggiore rispetto agli altri fluidi biologici, incluso il siero ematico (Mann, 1964), e gli antiossidanti che sono presenti nel PS compensano la mancanza degli enzimi citoplasmatici.

1.2.4. Ioni

La funzione spermatica è fortemente dipendente dalla presenza di ioni (Hamamah e Gatti, 1998). L'assunzione di minerali nella dieta ha un effetto positivo sulla concentrazione di ioni nel PS. Fosforo, calcio sodio e magnesio esercitano un ruolo importante nella bilancia osmotica e sono componenti importanti di molti enzimi. Il sodio è il principale catione nel PS (Setchell e Brooks, 1988). Il potassio è un inibitore metabolico naturale, e un'alta concentrazione di K nel PS diminuisce il metabolismo spermatico con conseguente diminuzione della motilità (Massanyi et al, 2003). Il calcio innesca la reazione acrosomiale negli spermatozoi di mammifero ed è anche coinvolto nella motilità (Kaya et al, 2002). Il magnesio è presente in tutti i sistemi enzimatici, è considerato come un marker della secrezione delle vescicole seminali (Wong et al, 2001), e può avere un ruolo importante nella motilità (Jobim et al, 2004).

1.2.5. Lipidi

Il profilo lipidico consiste in colesterolo, fosfolipidi, trigliceridi ed esteri. Possibile fonte di lipidi del PS può essere l'epididimo. Il contenuto di lipidi varia negli eiaculati.

1.3 Caratteristiche del plasma seminale equino

Il plasma seminale è un fluido costituito dalla secrezione combinata delle ghiandole accessorie del tratto genitale maschile addizionata al liquido epididimale e testicolare.

Nella specie equina, alla composizione della frazione liquida dell'eiaculato partecipano non solo le ghiandole vescicolari ma anche, con quantità inferiori, la prostata e le ampolle del dotto deferente (Mann, 1974). La composizione del plasma seminale nel cavallo, oggetto di diverse ricerche in un non recente passato, non si discosta da quella di altri mammiferi domestici. Sono state individuate proteine ed aminoacidi, enzimi, ioni organici, lipidi ed acidi grassi, ormoni e zuccheri (Mann, 1964; Tischner *et al.*, 1974; Kosiniak, 1975; Mann, 1975; Pickett *et al.*, 1975; Gebauer *et al.*, 1976; Kosiniak, 1979; Kosiniak, 1980; Kosiniak e Bittmar, 1981; White, 1984).

Tuttavia, la specie equina presenta alcune peculiarità come un'elevata concentrazione di glucosio (82 mg/dl) e bassi livelli di fruttosio (2 mg/dl), diversamente da quanto riscontrato nei ruminanti, nei quali quest'ultimo zucchero rappresenta il principale substrato utilizzabile per la glicolisi (Mann, 1974). Il metabolismo glucidico degli spermatozoi di stallone è di tipo prevalentemente aerobico.

Tuttavia, in particolari momenti, come subito dopo la deposizione del materiale seminale in utero, i nemaspermi sono in grado di sfruttare la glicolisi anaerobia per la scarsa presenza di ossigeno.

Successivamente a questa fase, durante la risalita degli spermatozoi lungo il tratto genitale femminile, diminuisce la concentrazione nemaspermatica e aumenta la pressione parziale dell'ossigeno creando così, le condizioni per un metabolismo di tipo aerobio. In condizioni di anaerobiosi, i nemaspermi sono in grado di utilizzare, anche se con minor efficienza rispetto alla glicolisi aerobia, il fruttosio (Mann, 1975).

Il plasma seminale contiene anche molecole come la glicerilfosforilcolina (GPC), prodotta nel cavallo a livello epididimale in quantità inferiore a 100 mg/dl, e l'ergotioneina, di derivazione ampollare con una concentrazione di 20-60 mg/dl (Mann, 1964 e 1975).

Fra gli acidi organici, oltre a lattato ed ascorbato, un costituente caratteristico del plasma seminale è l'acido citrico (citrato) presente con un range di concentrazione molto ampio (8-53 mg/dl, in media 26,1 mg/dl) (Mann, 1964). Il citrato è un prodotto della secrezione delle ghiandole vescicolari non solo nello stallone ma anche nel toro, arie-

te e verro (Mann,1964) mentre nell'uomo è di derivazione prevalentemente prostatica (Parente *et al.*, 1991).

La funzione dell'acido citrico nel liquido seminale non è stata ancora completamente chiarita, anche se è stato ipotizzato un suo ruolo nel formare complessi con lo ione calcio, nello svolgere un'azione tampone, nel contribuire al mantenimento dell'equilibrio osmotico e, nell'uomo, nell'intervenire nel processo di coagulazione-fluidificazione del seme (Parente *et al.*, 1991; Melotti *et al.*, 1996).

L'eiaculazione nello stallone inizia con una fase prespermatocica, acquosa, priva di nematospermi, GPC, ergotioneina e citrato, proveniente dalle ghiandole bulbo-uretrali e dalla prostata.

A questa segue una seconda frazione, espulsa dopo pochi secondi, proveniente dalla coda dell'epididimo, dai dotti deferenti, dall'ampolla e dalla prostata, ricca di spermatozoi, GPC ed ergotioneina. Infine viene eiaculata la terza frazione povera di nematospermi e ergotioneina ma ricchissima di citrato, proveniente dalle ghiandole vescicolari (Mann, 1964).

Considerando la diversa provenienza dei suoi componenti, l'indagine biochimica del liquido seminale potrebbe fornire utili informazioni sulle condizioni fisio-patologiche dell'apparato riproduttivo maschile o sulla possibile localizzazione di una disfunzione. Infatti, la presenza di una condizione patologica, che interessi l'attività secretoria di uno o più compartimenti dell'apparato riproduttore maschile, potrebbe determinare una specifica variazione della composizione biochimica del plasma seminale.

Il contenuto proteico del plasma seminale degli stalloni è relativamente basso (10mg/ml) se comparato con gli altri mammiferi (20-60 mg/ml).

Negli ultimi vent'anni sono stati fatti una serie di studi elettroforetici x caratterizzare queste proteine Von Fellenberg *et al.* (1985) hanno dimostrato che le proteine del plasma seminale tendono a formare degli aggregati multiproteici di circa 800 kDa di peso molecolare, composti da proteine di 11-30 kDa che sono circa il 70 % di tutte le proteine contenute nel PS.

Le proteine di MW tra i 13-122 kDa sono state studiate con l'elettroforesi a due dimensioni da Amann *et al.* (1985) e Brandon *et al.* (1999) e sono state individuate 14 proteine alcune delle quali sono state trovate in correlazione con la fertilità degli stalloni (Brandon *et al.* 1999).

Recentemente è stato descritto un numero di proteine costituenti una minor componente del PS di stallone, come la lactoferrina (Inagaki et al. 2002) che può originare dai testicoli come è stato visto nel cane (Kikuchi et al. 2003) come anche la leptina e fattori della crescita che promuovono la longevità degli spermatozoi (Lackey et al. 2002; Champion et al. 2002) e vari enzimi come la lipasi (Carver e Ball 2002), l' α 1,4-glucosidasi (Dias et al. 2004) e il convertitore dell'angiotensina (Ball et al. 2003).

1.4 Valutazione qualità del seme

La valutazione della qualità del seme può essere fatta in modo più o meno accurato in base alle risorse economiche . Il metodo più semplice usato di routine consiste nella determinazione del volume e della concentrazione (calcolando il numero totale degli spermatozoi) e la valutazione della motilità e morfologia degli spermatozoi. Test più specifici includono la determinazione del DNA spermatico, la reattività acrosomiale, una valutazione dell'integrità della membrana e uno studio al microscopio elettronico per le strutture intracellulari (International Congress of WEVA, 2-5 nov 2011).

2. MATERIALI E METODI

Il lavoro si è articolato in due momenti: uno sul campo, della durata di 4 mesi, per i prelievi del seme presso l'azienda Toniatti, e un secondo momento, nel laboratorio di Riproduzione del Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute di Padova per gli esami dei campioni.

2.1 Stalloni.

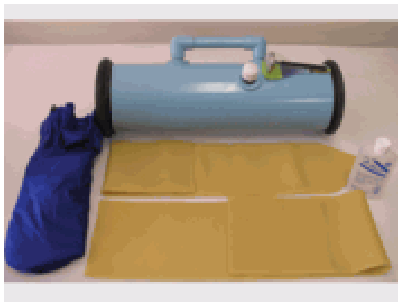
Sono stati studiati gli eiaculati di 7 stalloni appartenenti alla razza dei trottatori italiani, di età compresa tra i 9 e i 26 anni, di provata fertilità e in buono stato di salute, provenienti dai centri di produzione di sperma equino e fecondazione artificiale "Allevamenti Toniatti s.a.s." (Bibione – VE).

Tabella 2.1. Età e numero prelievi per stallone

Stallone	Età	n. prelievi
Stallone 1S	26 anni	1
Stallone 2P	25 anni	1
Stallone 3L	14 anni	8
Stallone 4N	12 anni	10
Stallone 5Ig	7 anni	7
Stallone 6I	7 anni	9
Stallone 7G	6 anni	10

2.2 Campionamento

Lo studio è stato effettuato su 46 campioni di sette stalloni. I prelievi sono stati fatti nei mesi di Aprile, Maggio, Giugno e Luglio ad intervalli di 3-7 giorni, utilizzando una vagina artificiale (Mod. Hannover, Colorado e Missouri) e un manichino.



a)



b)



c)

Foto 2.2. Modelli vagine artificiali utilizzate per i prelievi. a) colorado; b) hannover; c) missouri

Per gli stalloni più anziani (1S e 2P) è stato possibile raccogliere un unico campione in quanto, essendo di età avanzata, c'era una richiesta inferiore di seme da parte degli allevatori.

Una volta nel laboratorio della stazione di monta, con una pipetta sterile veniva è stato prelevato dall'eiaculato totale, un campione di 2 ml, messo poi in provetta.

Successivamente i campioni sono stati posti in una centrifuga a 3000 giri/minuto per 30 minuti, poi con una pipetta, si è estratto il plasma che è stato messo in un eppen-

dorf, successivamente sigillato con il parafilm, e posto infine in congelatore alla temperatura di -24°C fino all'utilizzo del campione.

2.3. Elettroforesi

Dai campioni, precedentemente scongelati, sono stati prelevati 2µl che sono stati messi in delle eppendorf, poi chiuse e poste a bagnomaria a 93°C per 20 minuti per ottenere la denaturazione delle proteine.

Infine, sono stati aggiunti 2µl di colorante e 10µl di acqua distillata, ottenendo così dei campioni da 14µl.

Per eseguire l'esame elettroforetico sono stati adoperati dei gel di acrilamide al 13% preparati il giorno prima dell'analisi e conservati in frigo.

La mattina della corsa si è preparato un nuovo gel di acrilamide al 4 % (stacking gel o gel di impaccamento) che è stato posto sopra al precedente. In questo secondo gel sono stati creati i 10 pozzetti dove inserire i campioni.

Una volta solidificato il secondo gel, con un puntale filiforme appositamente studiato per questo uso, sono stati inseriti i 14µl di campione in 9 pozzetti, mentre nel decimo è stato inserito un marker di peso molecolare per proteine (Precision plusProtein standards Kaleidoscope Markers, 10–250 kDa, RioRad, Milan, Italy).

Tabella 2.3. Componenti del gel di elettroforesi

	Composizione gel 13%	Composizione gel 4%
H ₂ O	3,1 ml	3,05 ml
acrilamide	4,3 ml	0,65 ml
Buffer pH 8,8	2,5 ml	0 ml
Buffer pH 6,8	0 ml	1,25ml
SDS	0,1 ml	50 μ l
APS	50 μ l	25 μ l
TEMED	5 μ l	10 μ l

Terminata l'operazione, i gel con i campioni sono stati messi nel sistema di elettroforesi verticale (mini-protean tetra cell, BioRad, Milan, Italy) collegato con un power supply (PowerPac Basic Power Supply, RioRad, Milan, Italy) con corrente costante a 2 mA per campione, nei primi 30 minuti, poi modificata a 4 mA per campione, per circa 1 ora e mezza.

Foto 2.4. Componenti miniprotean 3 System

A corsa finita, i gel sono stati posti per circa 30 minuti nel fissativo, successivamente immersi nel colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Biorad, Milan Italy) per al massimo 30 minuti, terminati i quali, messi in un contenitore con una soluzione decolorante per almeno 12h.

Terminata la fase di decolorazione sono stati conservati in acqua distillata.

Per poterli poi analizzare, i gel venivano posizionati su un negatoscopio e fotografati con una macchina digitale Pentax Optio M90 (Pentax).

Infine, le immagini digitalizzate sono state analizzate con il programma GelAnalyzer 2010. Con questo programma sono stati identificati i pesi molecolari delle varie bande e il loro relativo volume.

Foto 2.5. Gel elettroforesi del plasma seminale di stallone

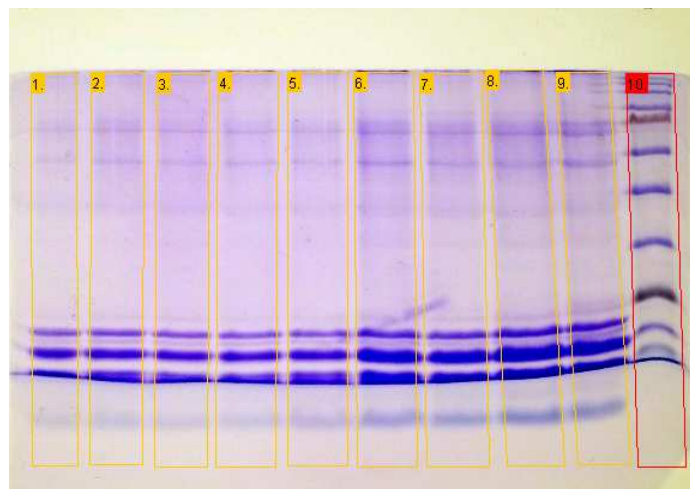
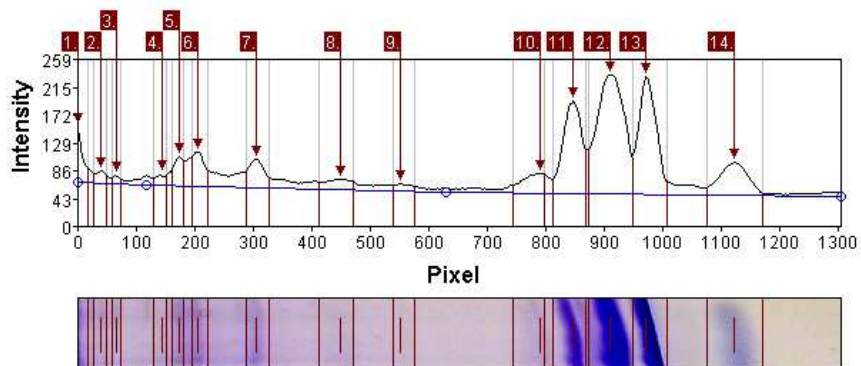


Foto 2.6. Selezione delle bande nelle varie corse dopo l'analisi del programma GelAnalyzer 2010



Immagine 2.7. Analisi della singola corsa da parte del programma GelAnalyzer2010



Dopo aver analizzato le corse dei singoli campioni e per poter studiare i dati in modo statistico le singole bande dei campioni sono state raggruppate in dieci classi in base ai pesi molecolari del marker come riportato nella tabella 2.8.

Tabella 2.8. Suddivisione in classi standard dei pesi molecolari (MW)

Range MW	Classe MW	MW marker
3-14	1	11
15-18	2	17
19-22	3	20
23-28	4	25
34-42	5	35
44-56	6	48
57-70	7	63
72-88	8	75
122-160	9	135
173-385	10	180

2.4 Valutazione biochimica del plasma seminale

L'analisi biochimica è stata effettuata dal laboratorio di Chimica Clinica ed Ematologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" utilizzando un sistema automatico di analisi.

2.5 Valutazione qualità del seme

Per ogni eiaculato è stata effettuata un'analisi standard come descritto in letteratura (Pickett et al., 1989; Varner et al., 1991).

Per la valutazione della concentrazione spermatica è stato utilizzato il fotometro Spermacue (Minitüb, Germania).



Foto 2.9. Spermacue minitube.Germania

La motilità è stata valutata tramite microscopia ottica dal veterinario ufficiale della stazione di monta.

Il volume è stato letto direttamente sul tubo graduato usato per la raccolta del seme.

I dati ottenuti sono stati suddivisi in due gruppi in base alla motilità (gruppo 1 motilità < del 70%; gruppo 2 motilità > del 70%).

Sono stati anche raccolti i dati sulla fertilità dei singoli campioni in base all'esito positivo o negativo sulla copertura delle fattrici. In questo modo è stato possibile suddividere gli eiaculati in due gruppi in base alle fattrici risultate positive (gruppo 1 positive < al 50%; gruppo 2 > del 50%). Inoltre è stato calcolato il tasso di fertilità per ogni singolo stallone.

2.6 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati analizzati tramite ANOVA utilizzando la procedura GLM del software SigmaStat 2.03 considerando come variabile indipendente la classe di motilità spermatica (< o > del 70%) e di Tasso di Gravidanza (< o > del 50 %). Inoltre è stata considerata una ANOVA con doppia variabile rappresentata dai singoli stalloni e dai salti monitorati (1°-7°). Infine sono stati valutati gli indici di correlazione di Pearson tra i parametri valutati (composizione biochimica del plasma seminale, risultati dell'analisi elettroforetica, qualità del seme e fertilità).

3. RISULTATI

3.1. Analisi elettroforetica

Con l'analisi elettroforetica monodimensionale con gel di acrilamide al 13% è stato possibile esaminare tutti i campioni di eiaculato comparandoli tra loro.

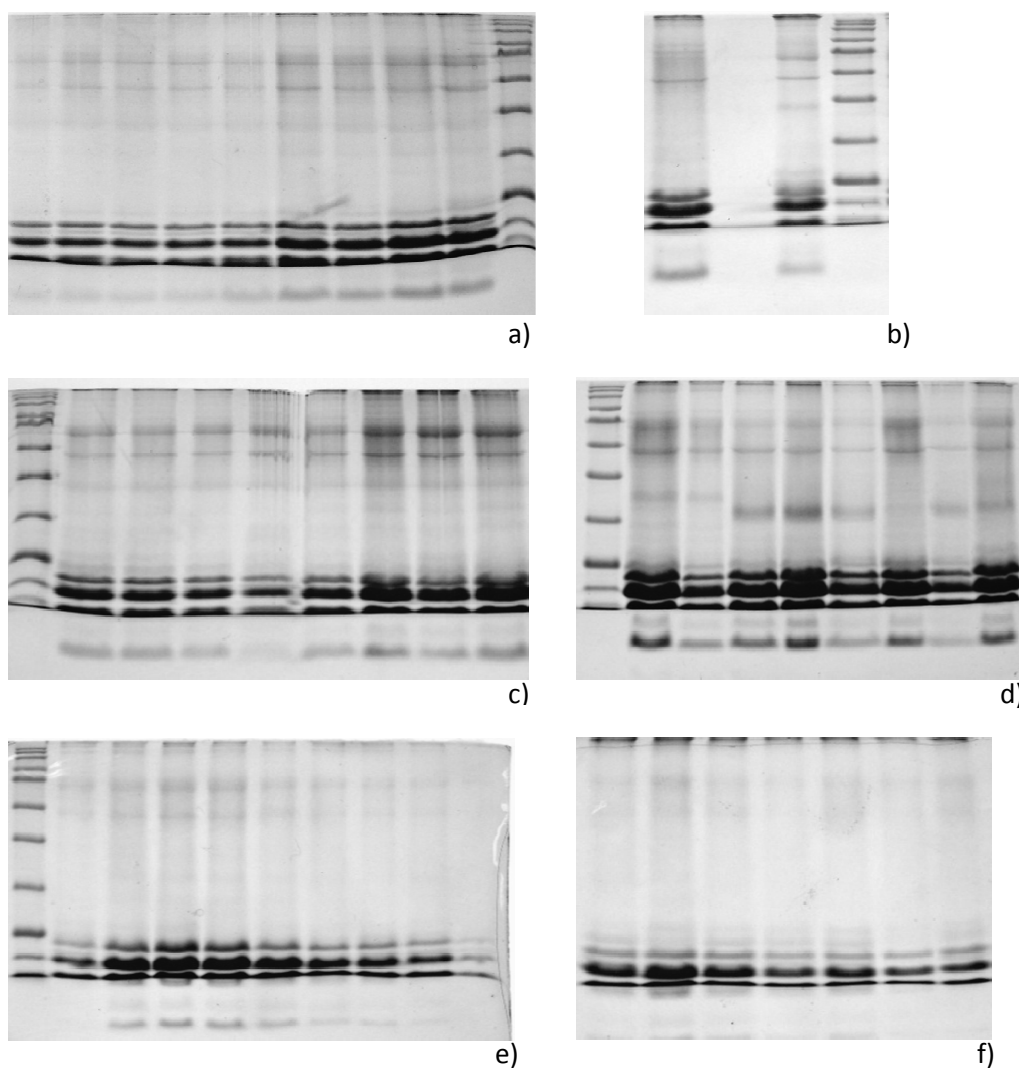
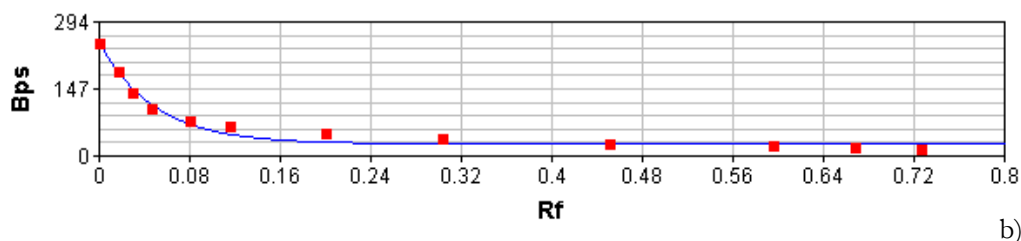
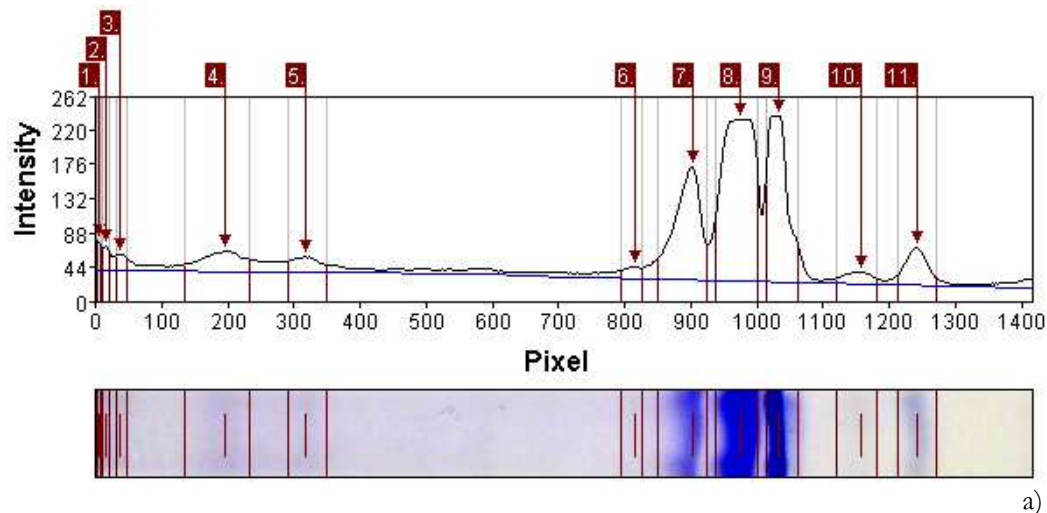


Immagine 3.1. Esempi di analisi elettroforetiche con gel al 13% del plasma seminale degli stalloni: a)3L; b)1S,2P; c)7g d)6I, e)4N e f)5Ig

Con il programma GelAnalyzer 2010 abbiamo calcolato i volumi e i pesi molecolari di ogni banda dei singoli campioni.



$$y = 221.82634 * e^{(-20.584404 * x)} + 26.738033$$

$$R^2 = 0.977$$

Lane #	Band #	MW	Raw volume
4	1	253	90
4	2	216	163
4	3	168	227
4	4	59	1570
4	5	45	1048
4	6	18	420
4	7	16	5021
4	8	15	10860
4	9	14	7944
4	10	11	861
4	11	10	1798

c)

Immagine 3.2. Esempio di un calcolo di un singolo campione con il programma GelAnalyzer 2010: a) grafico delle bande di una singola linea e del loro volume; b) relativa curva dei pesi molecolari e c) relativa tabella riassuntiva

Tutti questi dati sono stati inseriti in una tabella Excel dalla quale abbiamo ricavato i valori medi di ciascun parametro per ogni classe di pesi molecolari (MW).

Tabella 3.3. Valori medi di concentrazione e volume di ogni classe di pesi molecolari (MW)

Range MW	Classe MW	Volume %	Concentrazione mg/dl
3-14	1	14,68	0,19
15-18	2	16,77	0,21
19-22	3	10,79	0,11
23-28	4	6,01	0,05
34-42	5	4,70	0,05
44-56	6	3,95	0,05
57-70	7	5,31	0,07
72-88	8	3,97	0,05
122-160	9	1,38	0,02
173-385	10	2,69	0,03

Con questi dati abbiamo eseguito due analisi statistiche (1way ANOVA) utilizzando come variabili indipendenti nel primo caso i gruppi relativi alla motilità (<70%/>70%), mentre nel secondo quelli relativi alla percentuale di gravidanza (<50%/>50%).

Tabella 3.4. Valori (media \pm e.s.m.) del volume e della concentrazione delle classi delle bande elettroforetiche del plasma seminale di stalloni con differente motilità

	Motilità <70%	Motilità >70%	P
Volume % classe 1	14,77 \pm 1,6	14,64 \pm 0,95	0,94
concentrazione classe 1 (mg/dl)	0,15 \pm 0,02	0,21 \pm 0,03	0,18
Volume % classe 2	16,56 \pm 1,69	16,9 \pm 1,59	0,88
concentrazione classe 2(mg/dl)	0,18 \pm 0,03	0,22 \pm 0,03	0,33
Volume % classe 3	11,93 \pm 2,37	9,45 \pm 2,85	0,51
concentrazione classe 3 (mg/dl)	0,12 \pm 0,03	0,08 \pm 0,02	0,33
Volume % classe 4	5,99 \pm 2,05	6,01 \pm 1,81	0,99
concentrazione classe 4 (mg/dl)	0,04 \pm 0,34	0,045 \pm 0,02	0,75
Volume % classe 5	4,71 \pm 1,02	4,69 \pm 0,59	0,98
concentrazione classe 5 (mg/dl)	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,001	0,68
Volume % classe 6	3,47 \pm 0,24	4,22 \pm 0,31	0,11
concentrazione classe 6(mg/dl)	0,04 \pm 0,007	0,06 \pm 0,007	0,026
Volume % classe 7	5,17 \pm 1,29	5,38 \pm 0,9	0,89
concentrazione classe 7(mg/dl)	0,06 \pm 0,02	0,07 \pm 0,01	0,72
Volume % classe 8	3,81 \pm 0,62	4,16 \pm 0,73	0,71
concentrazione classe 8 (mg/dl)	0,04 \pm 0,008	0,05 \pm 0,02	0,37
Volume classe 9	0,78 \pm 0,27	1,47 \pm 0,18	0,18
concentrazione classe9 (mg/dl)	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,003	0,14
Volume % classe 10	3,1 \pm 0,51	2,45 \pm 0,31	0,26
concentrazione classe 10 (mg/dl)	0,03 \pm 0,006	0,3 \pm 0,006	0,74

Tabella 3.5. Valori (media \pm e.s.m.) del volume e della concentrazione delle classi delle bande elettroforetiche del plasma seminale di stalloni con differente percentuale di gravidanza

	gravidanza < 50%	gravidanza >50%	P
Proteine totali (mg/dl)	1,24 \pm 0,14	1,28 \pm 0,17	0,86
volume % classe1	15,23 \pm 0,05	14,04 \pm 0,04	0,48
concentrazione classe 1 (mg/dl)	0,19 \pm 0,03	0,19 \pm 0,03	0,89
volume % classe 2	15,76 \pm 1,71	17,94 \pm 1,56	0,36
concentrazione classe 2 (mg/dl)	0,17 \pm 0,03	0,25 \pm 0,04	1,13
volume % classe 3	13,08 \pm 2,94	8,31 \pm 2,13	0,2
Concentrazione classe 3 (mg/dl)	0,12 \pm 0,04	0,08 \pm 0,02	0,41
volume % classe 4	5,67 \pm 2,1	6,28 \pm 0,47	0,83
concentrazione classe 4 (mg/dl)	0,06 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01	0,61
volume % classe 5	5,09 \pm 0,87	4,19 \pm 0,24	0,42
concentrazione classe 5 (mg/dl)	0,05 \pm 0,01	0,06 \pm 0,01	0,85
volume % classe 6	4,15 \pm 0,35	3,71 \pm 0,99	0,33
concentrazione classe 6 (mg/dl)	0,054 \pm 0,01	0,05 \pm 0,02	0,96
volume % classe7	4,41 \pm 1,07	6,06 \pm 0,76	0,27
concentrazione classe 7 (mg/dl)	0,06 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01	0,48
volume % classe 8	3,45 \pm 0,58	4,81 \pm 0,22	0,17
concentrazione classe 8 (mg/dl)	0,043 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	0,58
volume % classe 9	1,51 \pm 0,28	1,27 \pm 0,43	0,52
concentrazione classe 9 (mg/dl)	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,96
volume % classe 10	2,74 \pm 0,37	2,64 \pm 0,43	0,86
concentrazione classe 10 (mg/dl)	0,04 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	0,73

3.2 Analisi biochimica

L'analisi biochimica è stata effettuata per ricercare in ogni campione i valori di urea, glucosio, colesterolo, trigliceridi, creatinina, Ca, Cl, K, Na, Mg, ALP, LDH, CK e proteine totali (PT).

Tabella 3.6. Valori medi degli elementi biochimici dei campioni di plasma seminale di stallone

Urea(mg/dl)	44,16	K(mg/dl)	44,16
Glucosio (mg/dl)	5,15	Na (mg/dl)	5,15
Colesterolo (mg/dl)	5,08	Mg(mg/dl)	5,08
Trigliceridi(mg/dl)	52,82	ALP (UI/l)	52,82
Creatinina(mg/dl)	0,61	LDH (UI/l)	0,61
Ca(mg/dl)	10,55	CK (UI/l)	240,87
Cl(mg/dl)	105,75	PT (mg/dl)	1,26

Come per i dati ottenuti dall'elettroforesi, anche con questi dati abbiamo eseguito due analisi statistiche (1way ANOVA) utilizzando come variabili indipendenti nel primo caso, i gruppi relativi alla motilità (<70%/>70%) e nel secondo, quelli relativi alla percentuale di gravidanza (<50%/>50%).

Tabella 3.7. Valori (media \pm e.s.m.) degli elementi del plasma seminale di stallone in relazione alla motilità

	Motilità <70%	Motilità >70%	P
Urea(mg/dl)	42,48 \pm 1,66	45,09 \pm 1,58	0,29
Glucosio (mg/dl)	5,08 \pm 0,98	5,19 \pm 1,19	0,95
Colesterolo(mg/dl)	3,92 \pm 0,47	5,75 \pm 0,62	0,05
Trigliceridi (mg/dl)	41,92 \pm 5,79	58,92 \pm 6,51	0,09
Creatinina(mg/dl)	0,51 \pm 0,05	0,68 \pm 0,06	0,05
Calcio (mg/dl)	11,5 \pm 1,65	9,97 \pm 1,74	0,56
Cloro (mg/dl)	103,32 \pm 3,07	107,2 \pm 0,85	0,14
Potassio(mg/dl)	20,63 \pm 1,8	21,78 \pm 1,34	0,61
sodio (mg/dl)	104,93 \pm 4028	113,96 \pm 3,22	0,09
magnesio (mg/dl)	7,46 \pm 1,02	4,26 \pm 0,65	0,009
ALP (UI/l)	5320,33 \pm 1362,76	7510,72 \pm 783,93	0,15
LDH (UI/l)	40,6 \pm 13,94	204,87 \pm 72,18	0,08
CK(UI/l)	59,26 \pm 21,96	349,84 \pm 150,39	0,15
PT (mg/dl)	1,12 \pm 0,13	1,33 \pm 0,15	0,36

Grafico 3.8. Valori di Urea, Trigliceridi, K, Cl e Na del plasma seminale rispetto alla motilità

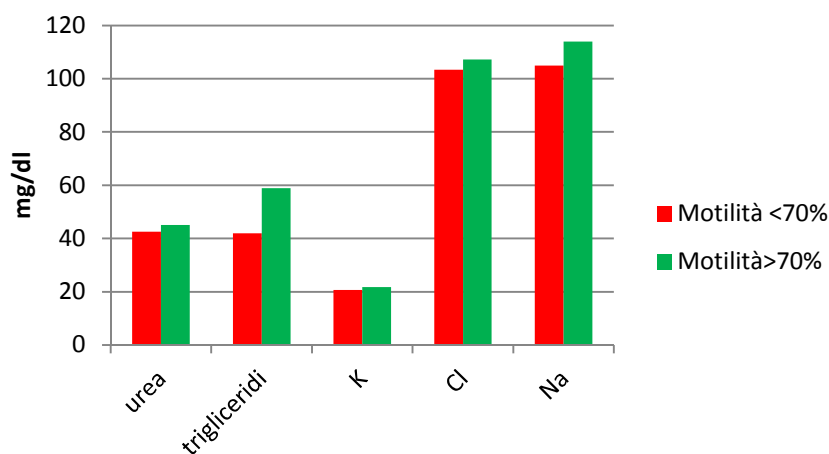


Grafico 3.9. Valori di Glucosio, Colesterolo, Creatinina, Ca, Mg e PT del plasma seminale rispetto alla motilità

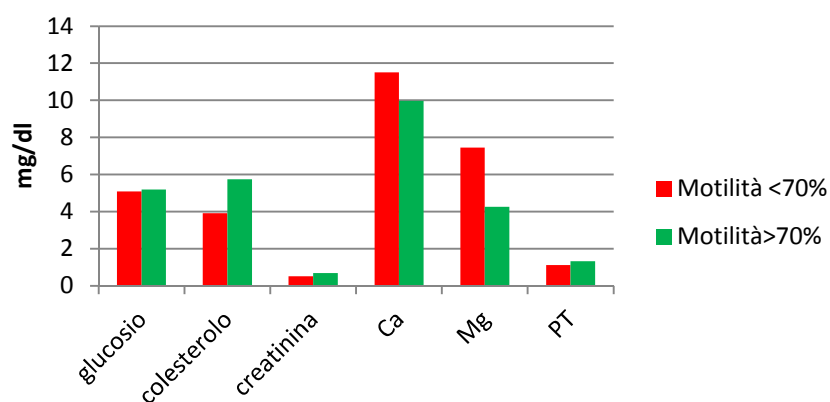


Grafico 3.10. Valori dell' ALP, LDH e CK del plasma seminale rispetto alla motilità

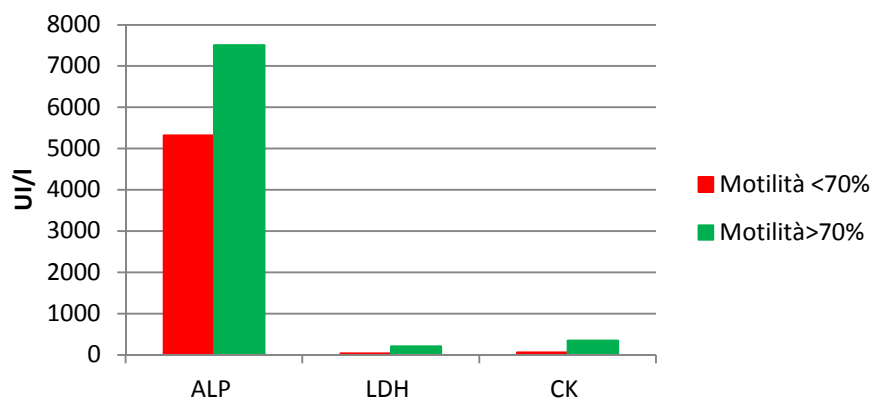


Tabella 3.11. Valori (media \pm e.s.m.) degli elementi del plasma seminale di stallone in relazione alla percentuale di gravidanza

	gravidanza < 50%	gravidanza >50%	P
Urea(ml/dl)	43,88 \pm 2	44,48 \pm 1,13	0,81
Glucosio (ml/dl)	5,32 \pm 1,29	4,97 \pm 1,05	0,84
Colesterolo(ml/dl)	4,5 \pm 0,48	5,72 \pm 0,78	0,18
Trigliceridi (ml/dl)	46,33 \pm 5,94	60,39 \pm 7,55	0,15
Creatinina(ml/dl)	0,59 \pm 0,07	0,65 \pm 0,05	0,5
Calcio(ml/dl)	10,73 \pm 1,48	10,63 \pm 1,82	0,95
Cloro (ml/dl)	105,16 \pm 2,29	106,4 \pm 0,99	0,63
Potassio(ml/dl)	21,06 \pm 1,65	21,67 \pm 1,37	0,78
Sodio (ml/dl)	109 \pm 3,1	112,32 \pm 4,43	0,54
Magnesio (ml/dl)	5,58 \pm 0,79	5,22 \pm 0,95	0,77
ALP(UI/l)	6779,64 \pm 921,82	6660,67 \pm 1270,37	0,94
LDH (UI/l)	71,55 \pm 25,59	215,53 \pm 89,11	0,12
CK (UI/l)	76,91 \pm 32,37	422,11 \pm 193,75	0,07
PT(ml/dl)	1,27 \pm 0,14	1,47 \pm 0,75	0,86

Grafico 3.12. Valori di Urea, Trigliceridi, K, Cl, Na del plasma seminale rispetto alla percentuale di gravidanza

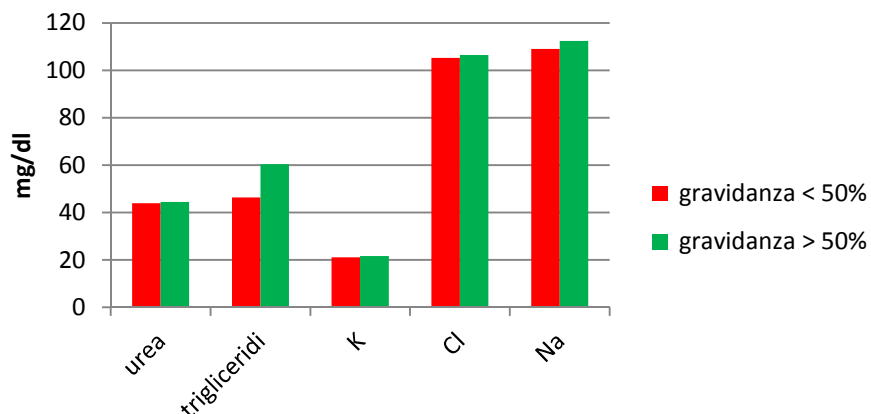


Grafico 3.13. Valori di Glucosio, Colesterolo, Creatinina, Ca, Mg e PT del plasma seminale rispetto alla percentuale di gravidanza

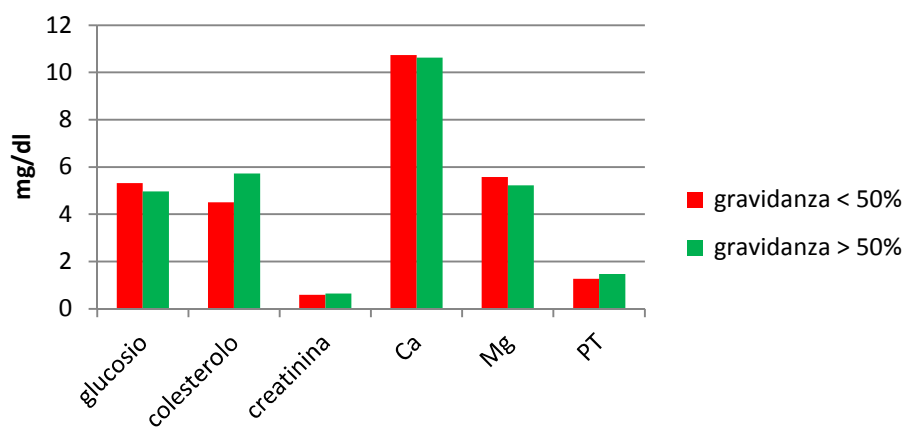
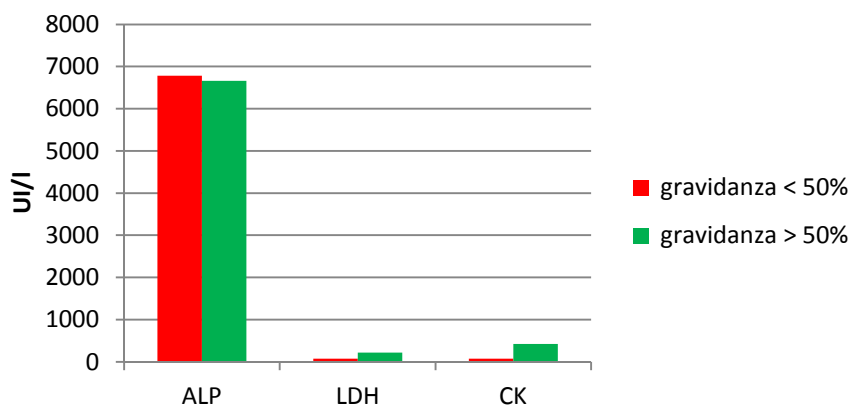


Grafico 3.14. Valori dell' ALP, LDH e CK del plasma seminale rispetto alla percentuale di gravidanza



3.4 Valutazione del seme

La valutazione del seme è stata fatta presso la stazione di monta degli allevamenti Toniatti immediatamente dopo il prelievo dal veterinario dell'azienda per quanto riguarda la motilità, volume e concentrazione. Mentre i dati sulla fertilità sono stati raccolti sull'esito positivo delle ecografie a 28 giorni. I dati raccolti sono stati inseriti in un foglio Excel per calcolare i valori medi. Questi sono stati sottoposti alle due analisi statistiche (1way ANOVA) prendendo sempre in considerazione come variabili indipendenti la motilità (<70%/>70%) e la percentuale di gravidanza (<50%/>50%).

Tabella 3.15. Valori (media \pm e.s.m.) dei parametri sulla qualità del seme del plasma seminale di stalloni con differente motilità spermatica

	Motilità <70%	Motilità >70%	P
Volume %	52,94 \pm 4,73	49,82 \pm 3,56	0,6
Concentrazione mg/dl	152,06 \pm 16,82	214,79 \pm 13,95	0,007
Motilità %	62,94 \pm 1,21	70,17 \pm 0,17	<0,001
Gravidanze %	62,23 \pm 9,27	52,72 \pm 5,99	0,37
gravidanze tot %	49,06 \pm 4,5	59,21 \pm 1,23	0,01

Tabella. 3.16. Valori (media \pm e.s.m.) dei parametri sulla qualità del seme del plasma seminale di stalloni con differente percentuale di gravidanza

	gravidanza < 50%	gravidanza >50%	P
Volume %	51,2 \pm 3,93	50,71 \pm 4,15	0,93
Concentrazione mg/dl	178,68 \pm 17,05	207 \pm 14,94	0,23
Motilità %	67 \pm 1,19	68,1 \pm 0,54	0,44
Gravide %	30,76 \pm 4,57	86,57 \pm 3,59	0,001*
Gravide totali %	52,28 \pm 3,28	59,24 \pm 1,42	0,08*

Grafico 3.17 . Parametri sulla qualità del seme del plasma seminale di stalloni in relazione alla motilità

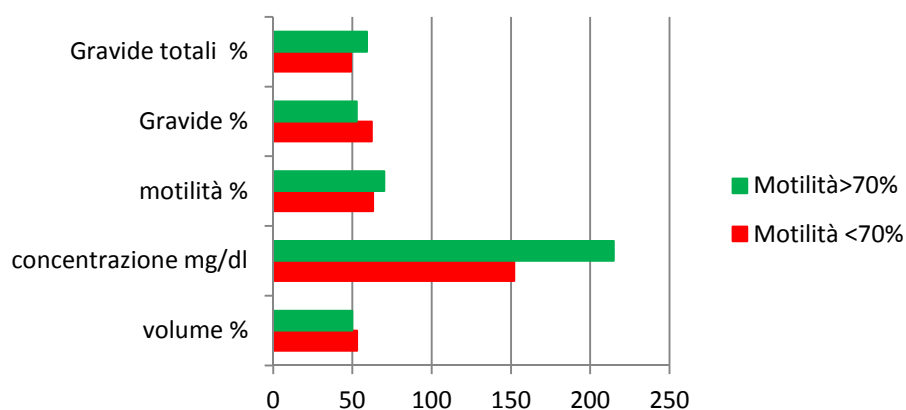
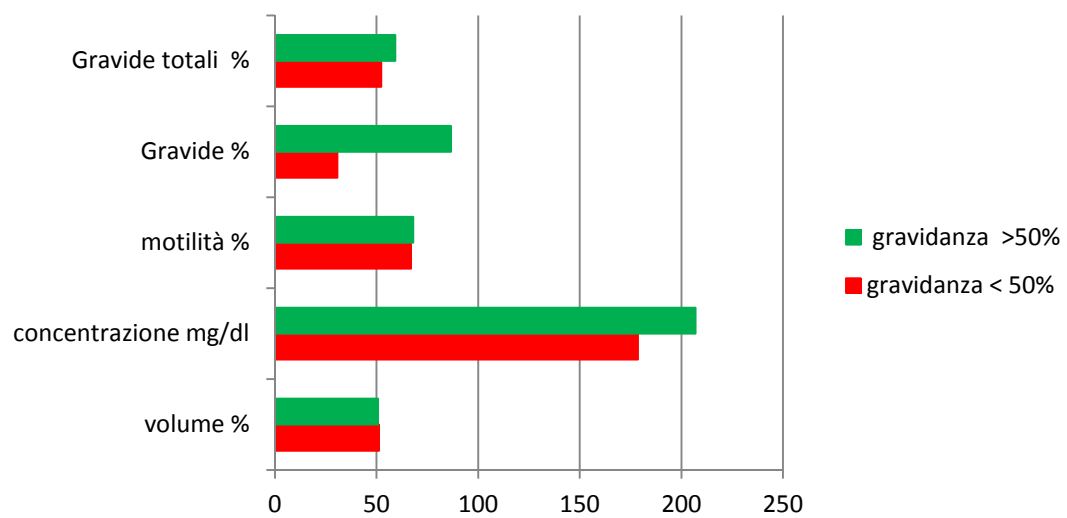


Grafico 3.18 .Parametri sulla qualità del seme del plasma seminale di stalloni in relazione alla percentuale di gravidanza



Abbiamo provato a mettere in relazione i dati dell'analisi biochimica e della qualità del seme con i singoli stalloni (escludendo 1S e 2P poiché avevamo un unico campione) e abbiamo visto che esistono delle correlazioni tra i diversi soggetti.

Tabella 3.19. Valori (media \pm e. m.s.) degli elementi biochimici del plasma seminale e della qualità del seme in relazione con i singoli stalloni. Le lettere differenti indicano una differenza significativa (a,b: $P < 0,05$)

stallone	7G	5Ig	6I	7L	4N
Urea (mg/dl)	53,48 \pm 3,35 ^a	43,85 \pm 3,10	37,74 \pm 3,33 ^b	39,94 \pm 2,98	44,81 \pm 2,71
Glucosio(mg/dl)	14,52 \pm 1,71 ^a	1,08 \pm 1,71 ^b	3,91 \pm 1,71 ^b	1,85 \pm 1,52 ^b	4,09 \pm 1,38 ^b
Colesterolo (mg/dl)	6,60 \pm 1,32	4,47 \pm 1,32	2,02 \pm 1,32	5,03 \pm 1,18	7,14 \pm 1,07
Trigliceridi(mg/dl)	33,42 \pm 15,32	58,50 \pm 13,74	34,17 \pm 15,26	66,61 \pm 13,66	81,29 \pm 12,42
Creatinina(mg/dl)	0,94 \pm 0,09 ^{ac}	0,73 \pm 0,09 ^{ab}	0,40 \pm 0,09 ^b	0,48 \pm 0,09 ^b	0,79 \pm 0,08 ^{ac}
Ca(mg/dl)	24,78 \pm 1,89 ^a	7,49 \pm 1,70 ^b	10,15 \pm 1,69 ^b	4,47 \pm 1,69 ^b	5,06 \pm 1,53 ^b
Cl (mg/dl)	108,21 \pm 3,90	106,31 \pm 3,50	100,76 \pm 3,48	105,43 \pm 3,48	107,21 \pm 3,16
K(mg/dl)	32,95 \pm 1,49 ^a	20,07 \pm 1,34 ^b	15,90 \pm 1,33 ^b	17,85 \pm 1,33 ^b	19,06 \pm 1,21 ^b
Na (mg/dl)	97,14 \pm 7,60	113,58 \pm 6,82	111,82 \pm 6,78	113,42 \pm 6,78	123,29 \pm 6,17
Mg(mg/dl)	7,46 \pm 1,41 ^a	2,10 \pm 1,26 ^b	5,89 \pm 1,40 ^b	5,44 \pm 1,25 ^b	3,01 \pm 1,14 ^b
LDH (UI/l)	207,53 \pm 134,65	96,79 \pm 120,74	0	33,88 \pm 134,09	481,29 \pm 109,12
CK(UI/l)	186,99 \pm ,276,72 ^{ab}	181,29 \pm 248,34 ^{ab}	0 ^b	0 ^b	989,29 \pm 224,51 ^a
PT (mg/dl)	1,63 \pm 0,24	1,19 \pm 0,24	0,87 \pm 0,27	0,67 \pm 0,27	1,44 \pm 0,30
Volume seme %	61,14 \pm 5,44 ^a	55,71 \pm 5,44 ^a	57,86 \pm 5,44 ^a	23,43 \pm 5,44 ^b	60,29 \pm 5,44 ^a
Concentrazione seme (mg/dl)	184,29 \pm 18,96 ^{ab}	225,43 \pm 18,96 ^a	106,14 \pm 18,96 ^a	235,29 \pm 18,96 ^b	203,29 \pm 18,96 ^a
Motilità %	70 \pm 0,98	67,14 \pm 0,98	67,86 \pm 0,98	67,86 \pm 0,98	70 \pm 0,98
gravide %	51,86 \pm 12,06	57,14 \pm 12,06	65,43 \pm 12,06	52,43 \pm 12,06	64,14 \pm 12,06

Le lettere differenti indicano una differenza significativa (a,b: $P < 0,05$)

Grafico 3.20. Valori medi di Glucosio, Colesterolo, Ca, K, Mg PT per ogni singolo stallone

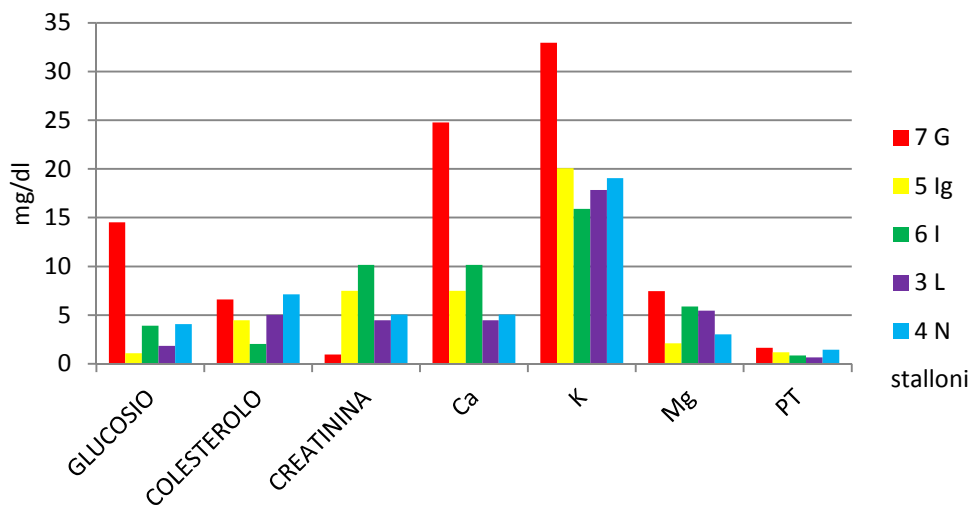


Grafico 3.21. Valori medi di Urea, Trigliceridi, Cl, e Na per ogni singolo stallone

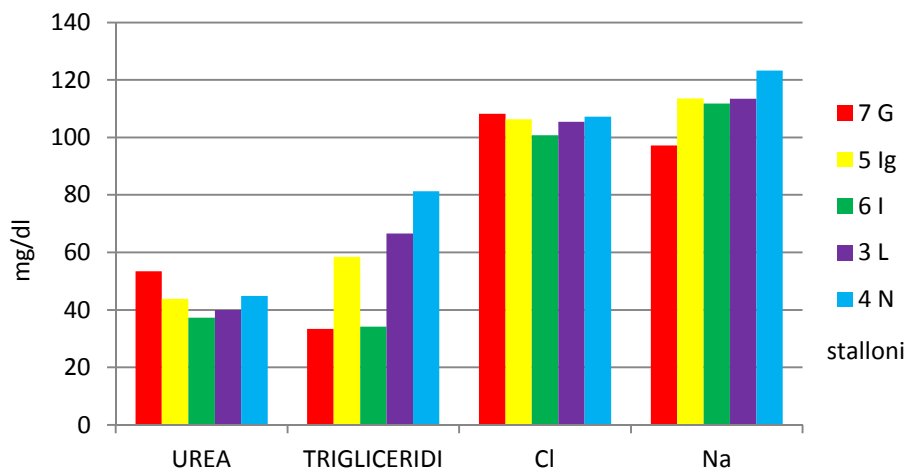
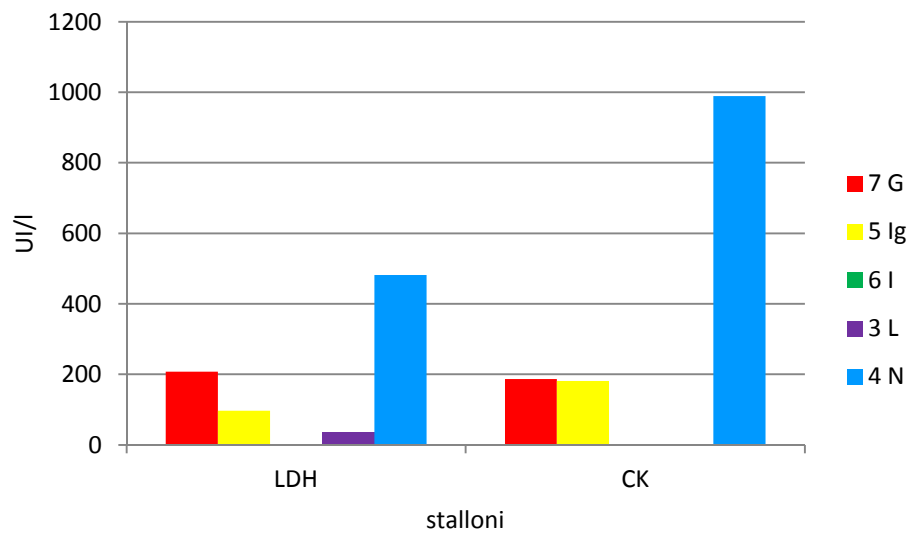


Grafico 3.22. Valori di LDH e CK dei singoli stalloni

gli stessi dati sono stati messi in relazione con i singoli salti ma non sono emerse correlazioni significative.

Tabella 3.23. Valori (media \pm e.m.s.) degli elementi biochimici del plasma seminale e della qualità del seme in relazione con i

Salto	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
Urea(mg/dl)	40,23 \pm 4,30	44,49 \pm 3,66	47,80 \pm 3,66	40,42 \pm 3,66	44,72 \pm 3,65	47,12 \pm 3,21	42,96 \pm 3,21
Glucosio (mg/dl)	5,84 \pm 2,20	5,38 \pm 1,87	5,46 \pm 1,87	3,84 \pm 2,20	5,32 \pm 1,87	5,3 \pm 1,64	4,5 \pm 1,64
Colesterolo (mg/dl)	5,99 \pm 1,70	3,74 \pm 1,44	5,14 \pm 1,44	3,46 \pm 1,70	4,25 \pm 1,44	5,8 \pm 1,26	7 \pm 1,26
Trigliceridi(mg/dl)	62,77 \pm 19,71	55,59 \pm 16,77	47,91 \pm 16,77	45,84 \pm 16,77	49,45 \pm 16,71	66,6 \pm 14,70	55,4 \pm 14,70
Creatinina(mg/dl)	0,66 \pm 0,12	0,52 \pm 0,11	0,80 \pm 0,11	0,70 \pm 0,15	0,74 \pm 0,11	0,75 \pm 0,11	0,51 \pm 0,09
Ca (mg/dl)	8,43 \pm 2,43	10,49 \pm 2,06	10,85 \pm 2,07	10,84 \pm 1,82	10,72 \pm 2,06	8,4 \pm 1,82	13 \pm 1,82
Cl (mg/dl)	92,05 \pm 5,01	106,32 \pm 4,26	109,26 \pm 4,27	108,8 \pm 3,74	111,94 \pm 4,26	106,54 \pm 3,74	104,18 \pm 3,74
K (mg/dl)	17,86 \pm 1,92	20,86 \pm 1,63	21,3 \pm 1,63	21,94 \pm 1,43	22,67 \pm 1,63	21,24 \pm 1,43	22,26 \pm 1,43
Na (mg/dl)	95,34 \pm 9,77	126,74 \pm 8,30	114,07 \pm 8,32	113,2 \pm 7,30	120,39 \pm 8,30	109,8 \pm 7,30	103,4 \pm 7,300,24
Mg(mg/dl)	2,57 \pm 1,81	4,02 \pm 1,54	6,15 \pm 1,54	5,77 \pm 1,54	3,22 \pm 1,54	4,18 \pm 1,35	7,48 \pm 1,35
LDH (UI/l)	323,97 \pm 173,21	0	43,08 \pm 147,34	42,6 \pm 129,11	106,42 \pm 147,41	283,42 \pm 147,41	334,4 \pm 129,11
CK (UI/l)	529,34 \pm 355,83	0	26,84 \pm 303,05	29,8 \pm 265,65	0	639 \pm 265,65	651,8 \pm 265-65
PT (mg/dl)	0,35 \pm 0,32	1,16 \pm 0,29	0,9 \pm 0,29	1,34 \pm 0,29	1,45 \pm 0,32	1,37 \pm 0,32	1,52 \pm 0,32
Volume %	51,8 \pm 6,43	51 \pm 6,43	58 \pm 6,43	53,4 \pm 6,43	57 \pm 6,43	38 \pm 6,43	52,6 \pm 6,43
Concentrazione(mg/dl)	189,6 \pm 22,43	187 \pm 22,43	128 \pm 22,43	198 \pm 22,43	194 \pm 22,43	248,4 \pm 22,43	191,2 \pm 22,43
Motilità %	67 \pm 1,16	70 \pm 1,16	67 \pm 1,16	68 \pm 1,16	69 \pm 1,16	71 \pm 1,16	68 \pm 1,16
Gravide %	73,4 \pm 14,27	42 \pm 14,27	80 \pm 14,27	55 \pm 14,27	36,6 \pm 14,27	39 \pm 14,27	81,4 \pm 14,27

Per approfondire ed avere ulteriori conferme sulla significatività di alcuni elementi abbiamo messo a confronto il dato medio di questi per ogni salto con i relativi valori degli stalloni

Grafico 3.24. Valori medi del Ca nei 7 salti in relazione ai singoli valori dei diversi stalloni

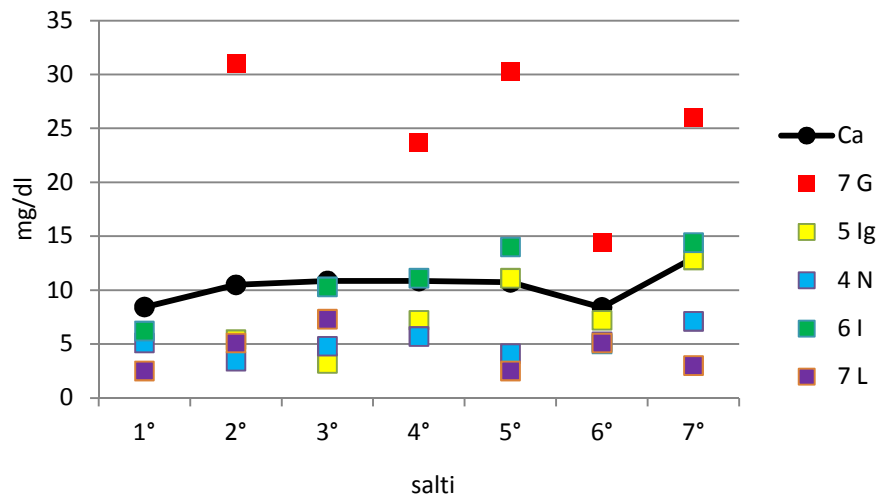


Grafico 3.25. Valori medi del Mg nei 7 salti in relazione ai singoli valori dei diversi stalloni

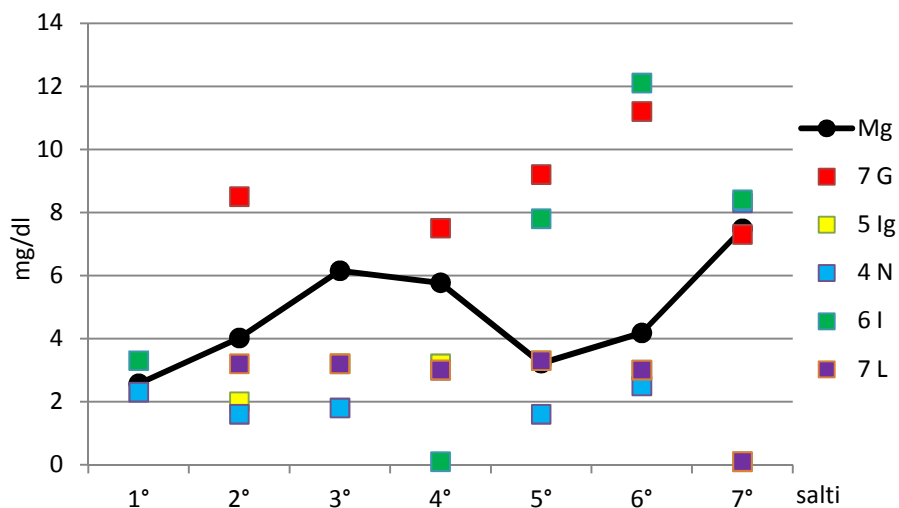


Grafico 3.26. Valori medi del colesterolo nei 7 salti in relazione ai singoli valori dei diversi stalloni

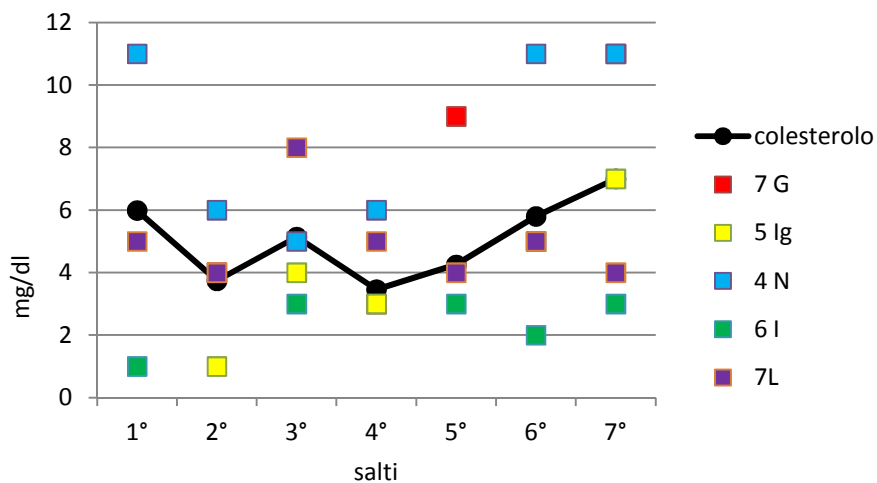


Grafico 3.27. Valori medi del LDH nei 7 salti in relazione ai singoli valori dei diversi stalloni

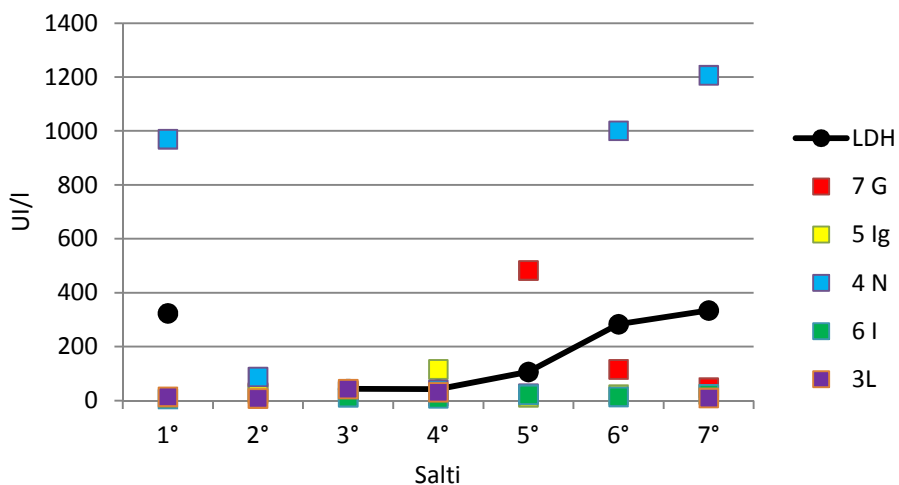


Grafico 3.28. Valori medi del Glucosio nei 7 salti in relazione ai singoli valori dei diversi stalloni

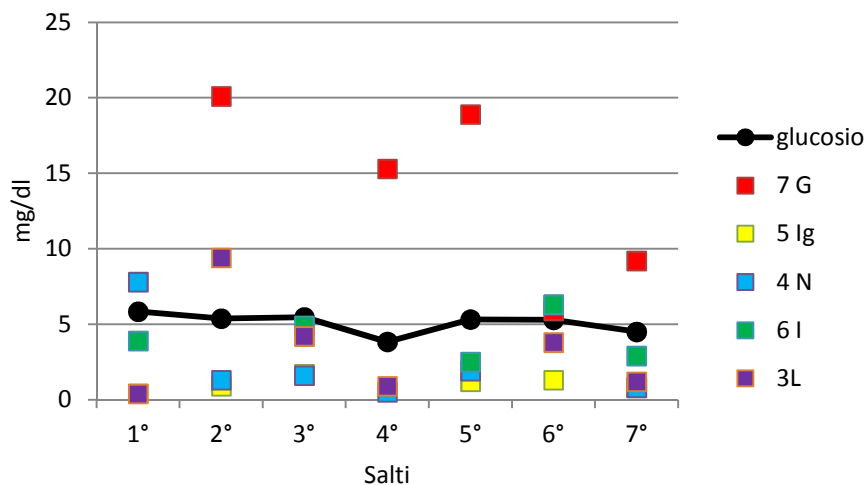
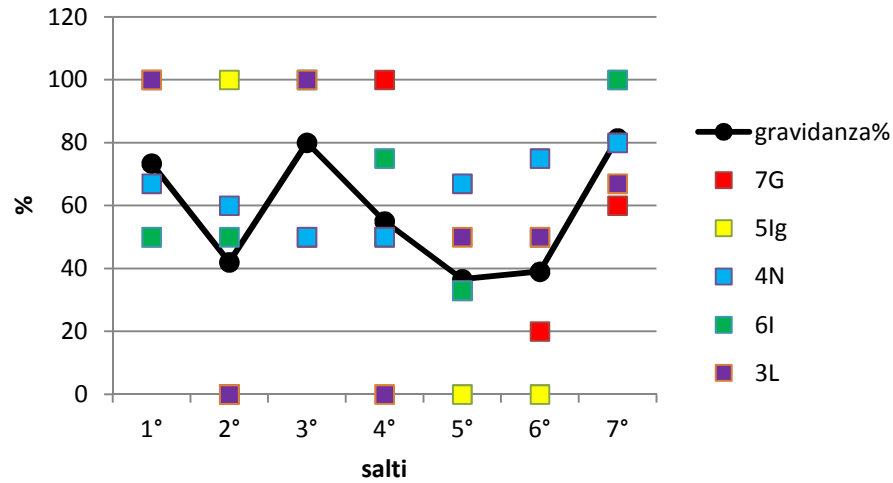


Grafico 3.29. Valori medi della gravidanza % nei 7 salti in relazione ai singoli valori dei diversi stalloni



3.4. Studio delle correlazioni

Sono stati messi in correlazione tutti i dati ottenuti per evidenziare la presenza o meno di indici di correlazione significativi ($P < 0,05$) e i risultati ottenuti sono riportati nella tabella di seguito allegata.

Tabella 3.30. Indici di correlazione tra i vari parametri con significatività ($P < 0.05$)

	Salto	g. mot	1 vol%	1 conc	2 vol%	2 conc	3 vol%	3 conc	4 vol%	4 conc	5 vol%	5 conc	6 vol%	6 conc	7 vol%	7 conc	8 vol%	8 conc	9 vol%	9 conc	10 vol%	10 conc	
salto					0,41	0,58					0,55		0,35		0,32		0,42		0,34	-0,60			
g. mot.														0,36									
1 vol%				0,57	-0,52	-0,3	-0,77	-0,63			-0,47				-0,52	-0,49							
1 conc						0,38	-0,74	-0,36			-0,37			0,73	-0,38	0,005				-0,29			0,62
2 vol%							0,62				0,61			-0,37			0,35				-0,45		-0,37
2 conc								-0,27			0,73		0,66		0,42		0,61		0,50			-0,29	
3 vol%									0,68			0,48			-0,44			0,38				-0,96	
3 conc												0,67					0,51	0,66			-0,95		
4 vol%										0,67	0,63			-0,6						-1	-1		
4 conc											0,73	0,86								1	1		
5 vol%												0,42											
5 conc														0,55		0,57		0,58			0,79		0,63
6 vol%															0,68					0,52			0,31
6 conc																					0,72		0,59
7 vol%																	0,79	0,61	0,73				
7 conc																		0,71			0,58		0,32
8 vol%																			0,75	-1	-1	0,36	0,42
8 conc																				1	1	0,38	0,75
9 vol%																					0,62	0,68	
9 conc																							0,68
10vol%																							0,68
10conc																							0,68

	urea	gluc	colest	trigr	crea	Ca	Cl	K	Na	Mg	ALP	LDH	CK	PT
Salto						0,31		0,29	-29					0,45
g. mot.			0,32	0,27	0,32					-0,41		0,28		
1 vol%														
1 conc					0,36									0,78
2 vol%					-0,51									
2 conc														0,73
3 vol%						-0,39								-0,42
3 conc														
4 vol%														
4 conc														
5 vol%			0,06											
5 conc				-0,39					-0,54					0,75
6 vol%	0,48	0,67		-0,41	0,54	0,72		0,7						
6 conc	0,44	0,54	0,33		0,49	0,69		0,72						0,77
7 vol%														
7 conc							-0,36	0,36	-0,39					0,44
8 vol%					0,45			0,37					0,37	
8 conc					0,61			0,46				0,51	0,66	0,66
9 vol%		0,58			0,52						0,91			
9 conc		0,62				0,64		0,73						0,63
10vol%														
10conc						0,38		0,47						0,59
Urea		0,59			0,61	0,48	0,49	0,51						
Glucosio					0,48	0,75		0,72	-0,35	0,45		0,29		
Colest				0,45	0,47			0,28				0,78	0,71	
Trigl						-0,42			0,28			0,46	0,49	
Crea						0,35	0,38	0,55				0,47	0,37	
Ca									-0,43	0,45				0,40
Cl								0,37	0,56					
K									-0,33	0,37				0,42
Na										-0,36				
Mg														
ALP														
LDH													0,96	
CK														
PT														

	Vol sperm	Conc sperm	mot	n. fatt	Fatt pos	% grav	g. grav	Tot fatt	n. fatt pos	% grav tot
Salto		0,36						0,29	0,26	0,31
g. mot.		0,39	0,75		0,12			0,34	0,36	0,37
1 vol%	0,32									
1 conc										
2 vol%	-0,52	0,35							0,26	
2 conc		0,39		0,33	0,42			0,51	0,54	0,32
3 vol%	-0,57			-0,48	-0,46	-0,48		-0,64	-0,63	-0,43
3 conc	-0,34					-0,45		-0,34	-0,36	
4 vol%	-0,69	0,77								
4 conc										
5 vol%		0,39								
5 conc										
6 vol%										
6 conc								0,38	0,31	
7 vol%										
7 conc								0,36	0,35	
8 vol%		0,39		-0,34					-0,33	
8 conc		0,47								
9 vol%	0,70									
9 conc										
10vol%			-0,27	-0,37	-0,34			-0,49	-0,47	-0,28
10conc		0,28								
urea										
glucosio	0,34	-0,28								-0,31
colesterolo		0,37	0,28	0,44	0,39			0,33	0,35	0,31
trigliceridi	0,28	0,40								
creatinina	0,31									
Ca	0,29									
Cl										
K										
Na										
Mg		-0,33	-0,42							-0,39
ALP										
LDH				0,52	0,52			0,41	0,43	
CK				0,51	0,53		0,28	0,37	0,41	
PT		-0,30		0,29				0,36	0,34	
Vol sperm		-0,54						0,31	0,28	
Conc sperm			0,49							0,43
Motilità				0,28				0,47	0,45	0,79
n. fattrici					0,85			0,63	0,63	0,4
Fatt pos						0,53	0,51	0,58	0,58	0,42
% gravid							0,81	0,28	0,27	0,38
g. gravid.									0,26	0,27
Tot fatt									0,98	0,66
Tot fatt pos										0,67
% grav tot										

Gruppo motilità <70%/>70% (g.mot.); volume % classe1 (1vol%); Concentrazione classe 1(1conc.); volume % classe 2 (2vol%); Concentrazione classe 2(2conc.); volume % classe3 (3vol%); Concentrazione classe 3(3conc.); volume % classe4 (4vol%); Concentrazione classe 4(4conc.); volume % classe5 (5vol%); Concentrazione classe 5(5conc.); volume % classe6 (6vol%); Concentrazione classe 6(6conc.); volume % classe7 (7vol%); Concentrazione classe 7(7conc.); volume % classe8 (8vol%); Concentrazione classe 8(8conc.); volume % classe9 (9vol%); Concentrazione classe 9(9conc.); volume % classe10 (10vol%); Concentrazione classe 10(10conc.); volume spermatico (vol.sperm); concentrazione sperma (conc. Sperm.); fattrici positive(fatt. pos.); percentuale gravidanza(% gravid.); gruppo gravidanza <50%/>50% (g.gravid.); totale fattrici (tot.fatt.); totale fattrici positive (tot.fat.pos.); percentuale gravidanza totale (% grav.tot.)

Di seguito vengono riportate le correlazioni più evidenti con $P < 0,05$ tra i parametri studiati:

- Tendenza alla correlazione negativa tra il numero del salto durante la stagione di monta e il volume percentuale della classe 9 (MW 122-160kDa)
- Correlazione negativa tra la classe 1 (MW 3-14 kDa) con la classe 3 (MW 19-22 kDa), sia per quanto riguarda la concentrazione che il volume.
- Correlazione negativa tra la classe 3 (MW19-22 kDa) e la classe 9 (MW122-160kDa)
- Correlazione negativa tra la classe 4 (MW 23-28 kDa) e la classe 9 (MW122-160 kDa)
- Correlazione positiva tra la classe 9 (MW122-160 kDa) e le classi 5 (MW34-42 kDa) e 6 (MW44-56 kDa).
- Correlazione negativa tra la classe 8 (MW 72-88 kDa) e la classe 9 (MW122-160 kDa)
- Correlazione negativa della classe 3 (MW19-22 kDa) con i parametri della fertilità del seme
- Correlazione negativa delle classi 1,2,3 e 4 con il volume dello sperma e positiva con la concentrazione dello sperma
- Correlazione positiva di LDH, CK, PT e colesterolo con i parametri della fertilità
- Correlazione negativa tra il Mg e i parametri della fertilità
- Correlazione positiva tra PT e CK
- Correlazione positiva del Ca con il Mg
- Correlazione negativa tra Ca e Na
- Correlazione negativa tra K e Na
- Correlazione positiva del K con il Mg
- Correlazione positiva del colesterolo con i trigliceridi, la creatinina, LDH e CK
- Correlazione negativa del glucosio con i parametri della fertilità
- Correlazione positiva tra glucosio e Mg

- Correlazione positiva tra la concentrazione e il volume dello sperma con i parametri di fertilità e motilità spermatica

4. DISCUSSIONE

Per dare un ordine consequenziale alle osservazioni dedotte dai dati ottenuti, riteniamo utile mantenere la suddivisione usata finora, tra lo studio proteico eseguito mediante elettroforesi, lo studio biochimico e quello relativo alla qualità del seme.

4.1 Valutazione proteica

Fin dal primo confronto visivo dei gel elettroforetici, si notano subito delle differenze per quanto riguarda lo spessore e la presenza o meno di certe bande, sia confrontando i campioni dei diversi stalloni, sia confrontando i campioni dei prelievi di uno stesso stallone. Questo ci fa supporre che alcune bande possano essere più significative di altre per valutare la qualità del seme.

Un'indagine più approfondita ci conferma che le differenze maggiori si riscontrano a livello delle bande delle classi 3 (MW 19-22 kDa) e 9 (MW 122-160 kDa).

Esse hanno tra loro una correlazione molto significativa, sia per quanto riguarda il volume che per quanto riguarda la concentrazione.

Le bande proteiche della classe 3 sono inoltre correlate positivamente con le bande dei pesi molecolari più bassi però con un'eccezione significativa per quanto riguarda le bande della classe 1 (MW 3-14 kDa) che sono correlate positivamente con quelle della classe 9.

A loro volta le bande della classe 9 sono correlate a quelle di peso molecolare maggiore. Fanno eccezione quelle della classe 8 (MW 72-88 kDa) che sono correlate positivamente con quelle della classe 3.

Se poi andiamo a vedere le relazioni di queste classi di bande significative (3 e 9) notiamo che le bande della classe 3 sono in correlazione negativa con gli indici di qualità

e fertilità del seme, infatti hanno valori più elevati, per quanto riguarda volume e concentrazione di questa classe, i campioni con motilità <70% e con percentuale di gravidanza <50%.

Ciò è confermato anche dallo studio di Calvete JJ et al (1995) che evidenzia come le proteine di 15,9 kDa e 18,2kDa (che sono incluse nella nostra classe 3) sono indici di scarsa qualità del seme. Analogamente anche la proteina HSP 15 di 26,7kDa è stata definita indice negativo di qualità seminale (Mattos RC et al 2004).

Al contrario le bande della classe 9 sono in correlazione positiva con gli indici di qualità e fertilità del seme infatti notiamo che hanno valori più elevati sia per il volume che per la concentrazione i campioni con motilità >70% e percentuale di gravidanza >50%. Proteine di peso molecolare tra 100-120kDa hanno la caratteristica di legare l'eparina e sembra abbiano un potenziale ruolo positivo sulla fertilità (Topfer-Peterson et al 2005).

Altre proteine sempre di alto peso molecolare prodotte dall'epididimo sembrano avere un ruolo positivo sugli spermatozoi nel tratto genitale femminile (Schamboni A et al 1998).

Si può quindi verosimilmente ipotizzare che la presenza elevata nell'esame elettroforitico del plasma seminale di stallone delle proteine con peso molecolare 15-28 kDa (classi 2,3 e 4) sia indicativa di una bassa qualità del seme.

Analogamente si può ipotizzare che l'elevata presenza di proteine di alto peso molecolare 34-70 kDa (classi 5,6 e7) e 122-385 (classe 9 e 10) sia indicativa di una buona qualità del seme.

Fanno eccezione le proteine con peso molecolare 3-14 kDa (classe 1) che pur avendo un basso MW sono correlate positivamente con le proteine della classe 9 e con i parametri della qualità del seme. Questo è confermato da studi precedenti in cui è descritta una proteina di 13kDa, omologa ad una proteina del plasma seminale bovino (BSP) con effetti positivi sulla fertilità (Calvete JJ et al 1995; Zalata A. et al 1996).

Lo stesso si può dire delle proteine di MW 72-88 kDa (classe 8) che sono correlate positivamente con quelle della classe 3 e negativamente con i parametri di qualità del seme. Diversi studi confermano che l'aumento della proteina con MW 75,4 kDa indica una concentrazione alta nel plasma seminale di transferrina che è collegata a disfunzioni testicolari con oligospermia ed è quindi indice negativo di fertilità (Aisep et al 1972; Balddwin G.S. 1993; Buckett WM et al 1997; Zalata A et al 1996).

Quanto fin qui ipotizzato risulta avvalorato anche guardando l'andamento della qualità e della fertilità del seme di uno stesso stallone nei diversi salti. Infatti nei singoli prelievi c'è la presenza di un maggior volume e concentrazione delle proteine della classe 3, nei prelievi dei salti con minor percentuale di gravidanza. Allo stesso modo le proteine della classe 9 erano maggiormente espresse nei prelievi relativi ai salti con maggior successo.

Possiamo quindi concludere che in base al nostro studio, la presenza elevata di proteine a basso MW è indicativa di una bassa fertilità mentre l'elevata presenza di proteine ad alto MW è indicativa di una buona fertilità.

4.2 Valutazione biochimica

I dati relativi alla concentrazione di alcuni elementi biochimici da una prima analisi ci indicano una possibile relazione con la qualità e fertilità del seme.

Infatti osservando i dati sulle correlazioni si vede che colesterolo, trigliceridi, LDH, CK, creatinina, ALP e PT sono correlati positivamente con la qualità e fertilità del seme. Infatti, questi elementi sono risultati avere una concentrazione maggiore sia nei campioni con motilità >70% che percentuale di gravidanza >50%. Addirittura ALP, LDH e CK hanno una concentrazione molto elevata (più del doppio) rispetto ai campioni con motilità <70%. Lo stesso si vede per quanto riguarda i valori di LDH e CK nei campioni con percentuale di gravidanza >50% mentre l'ALP risulta lievemente aumentato nei campioni <50%.

A conferma di ciò notiamo che esiste una correlazione positiva significativa (0.91) tra l'ALP e le proteine della classe 9. Del resto la fosfatasi alcalina(ALP) e la lattato deidrogenasi (LDH) sono due enzimi necessari alle reazioni metaboliche che forniscono energia agli spermatozoi. Essi, localizzandosi soprattutto a livello di membrana spermatica, sono considerati indicatori di stabilità della membrana stessa e quindi della qualità del seme (Corteel 1980).

Un'altra conferma si ha anche dagli studi di Turner (2003) e Kareskoski (2010) che correlano l' ALP con una maggior concentrazione e una maggior motilità degli spermatozoi.

Studi precedenti (Strzezek et al. 2005; E. Akcay et al. 2005) avvalorano la nostra ipotesi sul ruolo positivo delle proteine sulla fertilità. Essi affermano che la concentrazione delle PT nel plasma seminale diminuisce con l'avanzare dell'età degli stalloni. Ciò è riscontrato anche da noi nei due stalloni più anziani (1S e 2P) la cui fertilità è molto vicina allo zero.

Dall'esame sulle correlazioni abbiamo riscontrato anche che gli ioni Mg, K, Ca e Na sono indicatori di una minor qualità e fertilità del seme.

Lo stesso si può dire per il glucosio che è in correlazione negativa con la fertilità ed infatti è correlato positivamente con Mg, Ca e K che sono a loro volta correlati con una minor motilità e una minor percentuale di gravidanza. Ciò è riscontrato nei campioni con una motilità <70% e percentuale di gravidanza <50% che presentano concentrazioni di questi ioni più elevate rispetto agli altri due gruppi.

Ciò viene avvalorato dal fatto che il Ca va ad inibire l'attività della tirosin- fosforilasi che ha un ruolo chiave nel processo della capacitazione degli spermatozoi (Gonzales et al 2011) .

K e Na vanno ad agire a livello della membrana spermatica (MS) dando una perossidazione dei lipidi creando uno squilibrio sull'integrità della MS (Kareskoski, S. Sanca-ri et al 2011).

È dimostrato inoltre che il K è un indice di congelabilità del seme, infatti una sua bassa concentrazione nel plasma seminale favorisce il mantenimento della motilità degli spermatozoi durante la fase di congelamento (M. Kareskoski et al 2011).

Si ha un riscontro di ciò anche in medicina umana in quanto la presenza di un elevata quantità di Ca, Mg, Zn e Cu è correlata con l'infertilità (Pandi VK 1983, Huang YL et al 2000, Stanwell-smith R. et al 1983).

Quanto finora esposto trova conferma nell'osservare la correlazione tra le medie delle concentrazioni dei vari componenti biochimici nei diversi prelievi degli stalloni: si nota come 7G (stallone con la minor percentuale di gravidanza nei 5 presi in considerazione) abbia nei suoi campioni una concentrazione media molto maggiore di glucosio, Ca, K e Mg. Analogamente 4N (stallone più fertile) ha una concentrazione molto maggiore di LDH, CK, colesterolo e trigliceridi.

4.3 Valutazione del seme

Il nostro lavoro si è limitato ad osservare come i parametri volume, concentrazione e motilità del seme influiscano sulla fertilità.

Subito si nota come il volume sia un parametro poco significativo mentre concentrazione e motilità sono ovviamente correlate positivamente con la percentuale di gravidanza. Mentre questi risultati sono abbastanza intuitivi, è più interessante notare come la motilità sia correlata negativamente alle proteine della classe 3 e alla concentrazione di Mg e positivamente con le proteine della classe 9, la concentrazione di colesterolo e trigliceridi.

Per quanto riguarda la concentrazione notiamo che esiste una correlazione negativa con la concentrazione di glucosio e di magnesio mentre si ha una correlazione positiva con le proteine appartenenti alla prima classe di peso molecolare, con il colesterolo e i trigliceridi.

Questa correlazione con la classe 1 ci spiega come nonostante sia formata da proteine a basso MW sia comunque un indicatore di buona fertilità.

Per avvalorare ulteriormente la nostra ipotesi abbiamo confrontato l'andamento della fertilità nei singoli salti di ogni stallone confrontandola con gli indici che riteniamo essere positivi o negativi. Da ciò è risultata una nuova conferma; infatti, nei salti con la minor percentuale di gravidanza di ogni stallone è presente un aumento delle proteine della classe 3, della concentrazione di Mg, Ca e glucosio. Analogamente nei salti a maggior percentuale di fertilità sono aumentate le concentrazioni delle proteine della classe 9, LDH, colesterolo e CK.

LDH mostra essere l'enzima più importante per il metabolismo spermatico. La sua attività è correlata significativamente con il volume del seme, la concentrazione, la vita, la morte e la patomorfologia degli spermatozoi (Sandra Pesche t al 2005).

Anche il colesterolo è importante per mantenere integra e funzionale la membrana spermatica (Cross N.L. et al 2003; Gadella BM et al 2002; Sieber F et al 1987)

In più si è notato che nello stallone 4N (il più fertile) c'è una costante maggior presenza della concentrazione delle proteine della classe 9 ed anche del LDH; mentre una costante minor presenza della concentrazione delle proteine della classe 3 e del glucosio.

Al contrario lo stallone 7G (il meno fertile) presente una costante maggior presenza della concentrazione delle proteine della classe 3 e di Mg; mentre presenta una quasi mancanza delle proteine della classe 9 e basso valore di LDH.

Un altro aspetto interessante che è emerso è il progressivo sensibile aumento nell'avanzare dei salti della concentrazione di Cl, K e Na che potrebbero indicare un peggioramento progressivo della qualità del seme.

Questo potrebbe spiegare anche come nello stallone 4N nonostante i parametri rimangano favorevoli nei salti molto ravvicinati si ha un leggero aumento degli indici negativi ed una lieve diminuzione dei parametri positivi.

5. CONCLUSIONI

Lo scopo del nostro lavoro era cercare delle relazioni tra la composizione biochimica e proteica del plasma seminale degli stalloni con la qualità del seme. Gli esami elettroforetici eseguiti sui 46 campioni raccolti, gli esami biochimici e i dati raccolti sulla qualità e fertilità del seme ci possono far affermare che effettivamente esistono alcune correlazioni significative.

L'elettroforesi ci permette di affermare che le proteine di basso peso molecolare in particolar modo quelle di MW compreso tra i 19 -22kDa sono indicative di una minor fertilità.

La presenza invece di proteine ad alto MW in particolar modo quelle di MW compreso tra i 122-160kDa sono indice di una buona fertilità.

Analogamente l'esame biochimico ci porta ad affermare che alcuni micro e macroelementi contenuti nel plasma seminale sono correlati con la fertilità del seme.

L'aumento della concentrazione di Mg, Ca, K, Na e glucosio sono indici di una bassa fertilità. Mentre l'aumento della concentrazione di LDH, CK, Colesterolo, trigliceridi e PT sono indice di maggior fertilità.

Questi risultati potrebbero essere utilizzati per la preparazione di extender personalizzati per migliorare la fertilità del singolo stallone.

Sarebbe interessante vedere se queste correlazioni esistono anche con la congelabilità del seme, ma questo potrebbe essere oggetto di un ulteriore approfondimento.

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Akcay E, Reilas T, Andersson M, Katila T. 2005.** Effect of Seminal Plasma Fractions on Stallion Sperm Survival after Cooled Storage J.Vet. Med. A. 53,481-485
2. **Aisen P, Leibman A. 1972.** Lactoferrin and transferrin: a comparative study. Biochim Biophys Acta 1972; 257:314 –23.
3. **Alghamdi AS, Foster DN, Troedsson MHT. 2004.** Equine seminal plasma reduces sperm binding to polymorphonuclear neutrophils and improves fertility of fresh semen inseminated into inflamed uteri. Reproduction. 2004;127:593–600.
4. **Amann RP, Cristanelli MJ, Squires EL. 1985.** Proteins in stallion seminal plasma. J. Reprod. Fertil. 35 (Suppl.), 113–120.
5. **Amann RP. 1993.** Functional anatomy of the adult male. In: McKinnon AO, Voss JL (eds), Equine Reproduction. Lea & Febiger, 1993a Philadelphia: 645-657.
6. **Asadpour R, Alavi-Shoushtari SM, Asri Rezaii S, Ansari MHK. 2007.** SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bulls seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. Anim Reprod Sci 2007;102:308 –13.
7. **Aurich JE, Kühne A, Hoppe H, Aurich C. 1996.** Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. Theriogenology. 1996;46:791–797.

8. **Baldwin GS. 1993.** Comparison of transferrin sequences from different species. *Comp Biochem Physiol B* 1993;106:203–18.
9. **Ball BA, Gravance CG, Wessel MT, Sabeur K. 2003.** Activity of Angiotensin-converting enzyme (ACE) in reproductive tissues of the stallion and effects of angiotensin II on sperm motility. *Theriogenology* 59, 901–914.
10. **Barone R. 1994.** Apparecchio genitale maschile. In: Barone R (ed), Bortolami R ed. italiana, *Anatomia comparata dei mammiferi domestici*, vol. 4. Edagricole, Bologna: 77-185.
11. **Brandon CI, Heussner GL, Caudle AB, Fayer-Hosken RA. 1999.** Two-dimensional polyacrylamide electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52,863-873.
12. **Bucket WM, Luckas MJ, Gazvani MR, Aird IA, Lewis-Jones DI. 1997.** Seminal plasma lactoferrin concentrations in normal and abnormal semen samples. *J Androl* 1997;18:302– 4.
13. **Burgos C, Maldonado C, Gerez de Burgos NM, Aoki A, Blanco A. 1995.** Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isoenzyme C4 in mice. *Biol Reprod.* 1995;53:84–92.
14. **Calvete JJ, Mann K, Schafer W, Sanz L, Reinert M, Nessau S, et al. 1995.** Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochem J* 1995;310:615–22.

15. **Carluccio A, Tosi U, Battocchio M, Veronesi MC, De Amicis I, Contri M. 2006.** Citric acid and fructose seminal plasma concentrations and semen characteristics in the stallion. *Ippologia* 17;29-32
16. **Carver DA, Ball BA. 2002.** Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. *Theriogenology* 58, 1587–1595.
17. **Card C. 2005.** Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* 64;558-567.
18. **Champion ZJ, Vickers MH, Gravance CG, Breier BH, Casey PJ. 2002.** Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 57, 1793–1800.
19. **Chandonnet I, Roberts KD, Chapdelaine A, Manjunath P. 1990.** Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol Reprod Dev.* 1990;26:313–318.
20. **Chenier TS. 2000.** Anatomy and physical examination of the stallion. In: Samper JC (ed), *Equine Breeding Management and Artificial Insemination*. WB Saunders Co., Philadelphia: 1-25.
21. **Crabo G. 2001.** Physiological aspects of stallion semen cryopreservation. *AAEP Proceedings* vol 47:291-294
22. **Cross NL.** Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. *Biol Reprod* 2003;69:529–34.

23. **Dacheux J, Gatti JL, Dacheux F. 2003.** Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc Res Tech.* 2003;61: 7–17.
24. **Desnoyers L, Manjunath P. 1992.** Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *J Biol Chem.* 1992; 267:10149–10155.
25. **Dhami AJ, Kodagali SB.1990.** Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. *Theriogenology.* 1990;34:853–863.
26. **Dias AJ, Maia MS, Retamal CA, Lopez ML. 2004.** Identification and partial characterization of alpha-1,4-glucosidase activity in equine epididymal fluid. *Theriogenology* 61, 1545–1558.
27. **Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sanchez E, Cesari A, Alberio RH. 2008.** Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology.* 2008;69:564–573.
28. **Dyce kM, Sack WO, Wensing CJG, 2006.** *Anatomia Veterinaria.* Delfino, Roma: 559-563
29. **El-Hajj , Ghaoui R, Gillan L, Thomson PC, Evans G, Maxwell WMC. 2007.** Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl.* 2007;28:109–122.
30. **Faustini M, Veronesi MC, Carluccio A , Kindahl H, Cairoli F, Corteel JH. 1980.** Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermato-

- zoa kept in vitro. *Reproduction, Nutrition, Development*, vol. 20, pp. 1111 - 1123.
31. **Flipse RJ. 1960.** Metabolism of bovine semen IX glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase activities. *J Dairy Sci.* 1960;43:773–776.
 32. **Fortin R, Roncada P, Greppi G. 2005.** La proteomica applicata alla medicina veterinaria: prospettive e limiti *L.A.R.* 11 n.5;17-24
 33. **Gadella BM, Harrison RAP. 2002.** Capacitation induces cyclic adenosine 30,50-mono-phosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of amino-phospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod* 2002;67:340–50.
 34. **Garcia M, Graham E. 1987.** Factors affecting the removal of low–molecular weight fractions (LMWF) from egg yolk and seminal plasma in extended semen by dialysis: effect of post-thaw sperm survival. *Cryobiology.* 1987;24:437–445.
 35. **Gebauer MR, Pickett BW, Faulkner LC, Remenga EE, Berndtson WE 1976.** Reproductive physiology of the stallion. VIII. Chemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 43 (3) 628-632.
 36. **Gonzalez F, Garcia B, Velez IC, Varnerand DD, Hinrichs K. 2012.** Calcium–calmodulin and pH regulate protein tyrosine phosphorylation in stallion sperm *Reproduction Research* 411-422
 37. **Gundogun M. 2006.** Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi rams. *Turk J Vet Anim Sci.* 2006;30:95–100.

38. **Hamamah S, Gatti JL. 1998.** Role of the ionic environment and internal pH on sperm activity. *Hum Reprod.* 1998;13:20-30.
39. **Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR, Gray SL. 2000.** Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reprod.* 1998;59:330–337.
40. **Huang YL, Tsen WC, Cheng SY, Lin TH. 2007.** Trace elements and lipid Peroxydation in human seminal plasma. *Biol Trace Element Res* 2000;76:207–15.
41. **Inagaki, M., Kikuchi, M., Orino, K., Ohnami, Y., Watanabe, K., 2002.** Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. *J. Vet. Med. Sci.* 64,7577.
42. **Janett F, Burkhardt C, et al. 2006.** Influence of repeated treadmill exercise on quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* 65;1737-1749.
43. **Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Souza DO, Wald VB, Tramontina F, Mattos RC. 2004.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology.* 2004;61:255–266.
44. **Jobim MIM, et al. 2011.** Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *theriogenology*, 76 2011; 765-771

45. **Kaya A, Aksoy M, Tekeli T. 2002.** Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Res.* 2002;44:153–158.
46. **Kareskoski M, Katila T. 2008.** Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. *Anim Reprod Sci.*2008; 107:249-256
47. **Kareskoski M, et all. 2011.** The association of the presence of seminal plasma and its components with sperm longevity in fractionated stallion ejaculates. *Reproduction in domestic animals*, 46, 1073-1081.
48. **Kikuchi M, Mizoroki S, KuboT, OhiwaY, Kubota M, Yamada N, Orino K, Ohnami Y, Watanabe K. 2003.** Seminal plasma lactoferrin but not transferrin reflects gonadal function in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 65,
49. **Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. 1993.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod.* 1993;49:1202–1207.
50. **Kim JG, Kosiniak K. 1979.** Preliminary investigation of the role of the ampulla of the vas deferents in glycerylphosphorylcholine production in stallion. *Biul. Acad. Pol. Sci. Ser. Biol., II (1):* 75-78.
51. **Koppers J et all 2011** The role of cysteine-rich secretory proteins in male fertility *Asian J. Andrology* 13:111-117
52. **Kosiniak K, Bittmar A 1981.** Biochemical components of stallions seminal plasma before and after the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.,* 4: 39-47.

53. **Kosiniak K. 1980.** Udział wydzielin dodatkowych gruczołów płciowych w formowaniu ejakulatu u ogiera (The role of the accessory gland secretions during the ejaculate production in stallions). *Acta Agrar. Silvestria Ser. Zootech.*, 2: 75-86.
54. **Lackey BR, Gray SL, Henricks DM. 2002.** Measurement of leptin and insulin-like growth factor-I in seminal plasma from different species. *Physiol. Res.* 51, 309–311.
55. **Love CC, Kenney RM, 1999.** Scrotal heat stress induces altered sperm chromatin structure associated with a decrease in protamine disulfide bonding in the stallion. *Biol Reprod* 60: 615-20.
56. **McKinnon AO, Squires EL, Voss JL. 2004.** Management of the stallion for maximum reproductive efficiency, II. *Animal Reproduction Laboratory, Fort Collins*: 1-26.
57. **MaegawaM, KamadaM, IraharaM, Yamamoto S, Yoshikawa S, Kasai Y, Ohmoto Y, Gima H, Thaler CJ, Aono T. 2002.** A repertoire of cytokines in human seminal plasma. *J Reprod Immunol.* 2002;54:33–42.
58. **Mann T 1975.** Biochemistry of stallion semen. *J. Reprod. Fertil., Suppl* 23, 47-52.
59. **Mann T, Lutwak-Mann C.1981.** Male reproductive function and semen. In: *Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology.* Berlin: Springer-Verlag; 1981;495.

60. **Mann T. 1964.** Biochemistry of semen and of the male reproductive tract. Ed. Methuen, London.
61. **Mann T. 1964.** The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. end ed. London: Methuen; 1964.
62. **Mann T. 1974.** Secretory function of the prostate, seminal vesicle and other male accessory organs of reproduction. *J. Reprod. Fertil.*, 37: 179-188.
63. **Massanyi P, Trandzik J, Nad P, Toman R, Skalicka M, Korenekova B. 2003.** Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian J Androl.* 2003;5:101–104.
64. **Matousek J. 1985.** Biological and immunological roles of proteins in the sperm of domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 1985;8:1–40.
65. **Mattos RC, Jobim MIM, Oberst ER, Salbego CG, Wald VB, Horn AP, et al. 2004.** A seminal plasma marker of high semen freezability [abstract]. 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil 2004;2:462.
66. **Maxwell WMC, de Graaf SP, Ghaoui RE-H, Evans G. 2007.** Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:13–38.
67. **Melotti C, Parente R, Di Stasio D, Vitali G, Basunti G, Marchese S, Di Marzio G 1996.** Dosaggio dei Markers Prostato-Vescicolari (fruttosio e citrato) nel liquido seminale, mediante pH-Metria Differenziale. *Bioch. Clin.* 20: 90-97.

68. **Miro-Moran A , Jardin I, Ortega-Ferrusola C, Salido GM, Pen FJ et al. 2012.** Identification and Function of Exchange Proteins Activated Directly by Cyclic AMP (Epac) in Mammalian Spermatozoa. *Rafael Linden Brasil*:1-11.
69. **Neumark H, Schindler H. 1967.** Amino acids, amines and peptides of ram epididymal semen. *J Reprod Fertil.* 1967;14:469–471.
70. **Pandy VK, Parmeshwaran M, Soman SD.1983.** Concentrations of morphologically normal, motile spermatozoa: Mg, Ca and Zn in the semen of infertile men. *Sci Total Environ* 1983;27:49–52.
71. **Parente R, Melotti C, Zacchini A, Di Stasio D, Poli A !991.** Il laboratorio in andrologia: elementi di anatomia e fisiologia del tratto urogenitale. *Analysis, Ed. Liguria*,1:2-71
72. **Parlevliet JM, Pearl CA, Hess MF, Famula TR, Roser JF, 2006.** Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology* 66: 755–65.
73. **Parthasarathy S. 1998.** Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Med.* 1998;16:235–339.
74. **Pesch S, Bergmann M. 2005.** Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality . *Theriogenology*, 66:307-313

75. **Pickett BW, et al. 1975.** Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *J. Anim. Sci.* 40: 917-923.
76. **Ratto MH, et al. 2012.** The nerve of ovulation inducing factor in semen. *G.E.Seidel.* 2012
77. **Rajeshknaz, Preeti B. 2004.** Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. *Reproductive biology and Endocrinology,* 2:75.
78. **Robertson SA, Ingman WV, O’Leary S, Sharkey DJ, Tremellen KP. 2002.** Transforming growth factor b—a mediator of immune deviation in seminal plasma. *J Reprod Immunol.* 2002;57:109–128.
79. **Robertson SA. 2005.** Seminal plasma and male factor signalling in the female reproductive tract. *Cell Tissue Res.* 2005;322:43–52.
80. **Roser JF, 2001.** Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. *Anim Reprod Sci* 68: 139–51.
81. **Rozeboom KJ, Troedsson MH, Hodson HH, Shurson GC, Crabo BG. 2000.** The importance of seminal plasma on the fertility of subsequent artificial inseminations in swine. *J Anim Sci.* 2000;78:443–448.
82. **Sanchez-Luengo S, Aumuller G, Albrecht M, Sen PC, Rohm K, Wilhelm B. 2004 .** Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺- ATPase. *J Androl.* 2004;25:234–244.

83. **Schambony A, Gentzel M, Wolfes H, Raida M, Neumann U, Töpfer-Petersen, E. 1998.** Equine CRISP-3: primary structure and expression in the male genital tract. *Biochim Biophys Acta* 1998;1387:206–216.
84. **Setchell BP, Brooks DE. 1988.** Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract In: Knobil E, Neill J, eds. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988;753–836.
85. **Sieber F. 1987.** Meyocyanine 540. *Photochem Photobiol* 1987;46:1035–42.
86. **Sirat MP, Sinha AK, Singh BK, Prasad RL. 1996.** Effects of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology*. 1996;45:405–416.
87. **Souza CE, Moura AA, Monaco E, Killian GJ. 2008.** Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1/A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:72–89.
88. **Stanwell-Smith R, Thompson SG, Haines AP, Ward RJ, Cashmore G, Stedronska J, et al. 1983.** A comparative study of zinc, copper, cadmium, and lead levels in fertile and infertile men. *Fertil Steril* 1983;40:670–7.
89. **Stelletta C, Juyena NS. 2012.** Seminal plasma. An essential attribute to spermatozoa. *J. Andrology* vol. 33;1-11
90. **Strzezek J, Wysocki P, Kordan W, Kuklinska M, Mogielnicka M, Soliwoda D, Fraser L. 2005.** Proteomics of boar seminal plasma-current

- studies and possibility of their application in biotechnology of animal reproduction. *Reproductive Biology* 5:279-290.
91. **Tang FY, Hoskins DD. 1975.** Phosphoprotein phosphatase of bovine epididymal spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1975;62:328–335.
 92. **Therien I, Moreau R, Manjunath P. 1998.** Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod.* 1998;59:768–776.
 93. **Tischner M, Kosiniak K, Bielansky W.1974.** Analysis of the pattern of ejaculation in stallion. *J. Reprod. Fertil.* 41: 329-335.
 94. **Topfer-Petersen E, et al. 2005.** The role of stallion seminal proteins in fertilisation. *A:R:S:* 89;159-170.
 95. **Troedsson MHT, Desvousges A, Alghamdi AS, Dahms B, Dow CA, Hayna J, Valesco R, Collahan PT, Macpherson ML, Pozor M, Buhi MC. 2005.** Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. *Anim Reprod Sci.* 2005;89:171–186.
 96. **Troedsson MHT.2000.** The role of seminal plasma in the modulation of breeding induced endometritis. *Ippologia* 11 n.3;29-34
 97. **Tummaruk P, Lundeheim N, Einarsson S, Dalin AM. 2000.** Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: II, Effect of mating type, weaning-to-first service interval and lactation length. *Acta Agric Scand.* 2000;50:217–224.

98. **Upreti GC, Hall EL, Koppens D, Olivier JE, Vishwanath R. 1999.** Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Anim Reprod Sci.*1999;56:107–121.
99. **Varner DD, Schumacher J, Blanchard T, Johnson L. 1991a.** Breeding soundness examination. In: Varner DD, Schumacher J, Blanchard T, Johnson L (eds), *Diseases and management of breeding stallion*. American veterinary publications, Goleta: 61-96.
100. **Varner DD, Schumacher J, Blanchard T, Johnson L. 1991c.** Reproductive anatomy and physiology. In: Varner DD, Schumacher J, Blanchard T, Johnson L (eds), *Diseases and management of breeding stallion*. American veterinary publications, Goleta: 1-59.
101. **Vasconcelos AB, et al. 2009.** Purification and partial characterization of proteinase inhibitors of equine seminal plasma. *Reproductive biology* vol 9;151-159
102. **Veronesi MC, Carluccio A, Kindahl H, Faustini M, Cairoli F, Corteel JH. 2005.** Plasmatic and seminal 15-ketodihydro- gf_2 concentrations during mating in the stallion *Ippologia* 16 n.4:39-42
103. **Villemure M, Lazure C, Manjunath P. 2003.** Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;1:39–48.
104. **von Fellenberg, R., Zweifel, H.R., Grunig, G., Pellegrini, A., 1985.** Proteinase inhibitors of horse seminal plasma. A high molecular mass, acid-soluble proteinase inhibitor. *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.* 366, 705–712.

105. **White IG. 1984.** Secrezioni dell'apparato riproduttore maschile e liquido seminale. In: Hafez ESE Ed.: *Biologia e Tecnologia della Riproduzione nelle Specie Animali di Interesse Zootecnico*. Grasso, Bologna; 186-198.
106. **White IG, Wallace JC. 1961.** Breakdown of seminal glycerylphosphorylcholine by secretions of the female reproductive tract. *Nature*. 1961; 189:843-844
107. **Wong WY, Flik G, Groenen PM, Swinkels DW, Thomas CM, Copius- Peereboom JH, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. 2001.** The impact of calcium, magnesiumzinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Reprod Toxicol*. 2001;15:131–136.
108. **Yanagimachi R. 2008.** Fertility of mammalian spermatozoa: its development 2008;107:249–256.
109. **Zalata A, Hafez T, Schoonjans F, Comhaire F. 1996.** The possible meaning of transferrin and its soluble receptors in seminal plasma as markers of the seminiferous epithelium. *Hum Reprod* 1996;11:761– 4.