



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E
SALUTE

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in
Medicina Veterinaria

Sviluppo e applicazione di un test di adesione spermatica alle cellule oviduttali nella specie bovina

Relatore

Prof. Calogero Stelletta

Laureanda: Giulia Gollin

Matricola n. 564606

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

Alla mia Famiglia.

INDICE

Riassunto	7
Abstract	8
1. INTRODUZIONE	9
1.1 TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA	9
1.1.1 Inseminazione Artificiale	10
1.1.2 Superovulazione e Trasferimento Embrionale	11
1.1.3 Sessaggio Seminale	12
1.1.4 Produzione Embrionale <i>In Vitro</i>	12
1.2 L' ODISSEA DELLO SPERMATOZOO.....	15
1.2.1 Capacitazione.....	17
1.2.2. Iperattivazione	19
1.3 TEST FUNZIONALI PER LA VALUTAZIONE DEL SEME.....	20
1.3.1 Computer Assisted Sperm Analysis (C.A.S.A).....	21
1.3.2 Citometria a Flusso	24
1.3.3 Prove <i>In Vitro</i> di Adesione Spermatica alla Zona Pellucida e alle Cellule Oviduttali.....	25
1.4 ANATOMIA DELL' OVIDOTTO	27
1.4.1 Fluido Oviduttale	28
1.4.2 Interazione tra Sperma e Fluido Oviduttale.....	30
<i>SCOPO DELLA TESI</i>	33
2. MATERIALI E METODI	34
2.1 FASE DI SVILUPPO DEL TEST.....	34
2.2 ESECUZIONE DEL TEST SU SEME DI TORI CON FERTILITA' DI CAMPO NOTA E CON TORI BURLINI	37

<i>Raccolta dati</i>	37
<i>Test di adesione su tori con diversa classe di ercr</i>	38
<i>Test di adesione su tori Burlini senza classe di ercr</i>	38
<i>Analisi descrittiva e statistica</i>	38
3. RISULTATI	40
4. DISCUSSIONE	45
5. CONCLUSIONI	52
6. BIBLIOGRAFIA	53

RIASSUNTO

Le classiche procedure per la valutazione del seme basate sul *breeding soundness evaluation* (BSE) richiedono tempi e costi elevati. Tecniche incluse in questa valutazione come il CASA hanno dimostrato avere dei limiti sia per quanto riguarda la mancata standardizzazione degli strumenti usati nei diversi laboratori e sia per i diversi metodi di analisi dei dati. Inoltre recenti studi mettono in dubbio l'effettiva capacità predittiva di questo mezzo per quanto riguarda la fertilità in campo del seme. Molti studi si sono quindi concentrati nell'individuare un test semplice e oggettivo in grado di dare la massima correlazione tra risultati in vitro e in vivo. Tra i test in vitro è stato valutato il test di adesione spermatica alle cellule oviduttali. In questo studio oltre allo sviluppo di un protocollo ripetibile di test di adesione spermatica ad espianto oviduttale si è valutata l'attendibilità con dati relativi ai parametri CASA e alla fertilità di campo. In ultima analisi si è applicato il test a tori di razza Burlina di cui non si è a conoscenza di alcun parametro circa l'effettiva fertilità considerato il limitato numero di soggetti disponibili per studi standard di fertilità. Analizzando i risultati si è visto come questo test sia capace di fornire una previsione sulla fertilità del seme in quanto tori con fertilità di campo diversa hanno mostrato una diversa risposta al test di adesione. Il test inoltre ha dimostrato dare informazioni aggiuntive ai metodi standard di valutazione seminale.

ABSTRACT

The common procedures for sperm evaluation based on breeding soundness evaluation (BSE) are both expensive and time-consuming. Methods such as CASA have shown their limits in reference to the lack of instrument and data-analysis standardization. Recent studies question the effectiveness of BSE-based techniques in predicting sperm fertility. Several studies focused on finding a simple and reliable test providing maximal correlation between in-vitro and in-vivo results. Among in-vitro tests, the sperm—oviductal cells adhesion test has been evaluated. In this work we assessed both a repeatable protocol for this test and its coherence with CASA parameters and field data. The test has then been applied to Burlina-bulls, an endangered species whose fertility rate is currently unknown. Test results show a satisfying level of predictability of the fertility rate. The test also provides additional data compared to standard semen-evaluation methods.

1. INTRODUZIONE

L'applicazione di biotecnologie animali e specialmente quella relativa alla riproduzione (conosciuta come *Assisted Reproductive Techniques*, ART) è una realtà in espansione nei paesi in via di sviluppo e nelle aree in cui l'allevamento bovino e degli animali di interesse zootecnico ha la sua maggior attività/crescita (Martinez, 2012). Lo scopo primario di tutte le nuove biotecnologie è di aumentare la produzione sia nel settore lattiero-caseario che in quello della carne (Velazquez, 2007; Faber et al., 2003). Lo studio e l'applicazione di queste tecniche permettono di ottenere i seguenti risultati:

- incrementare la produttività e la qualità dei prodotti di origine animale;
- facilitare la diffusione a livello globale di materiale genetico di alto valore;
- salvare specie o razze in via d'estinzione;
- creare prole di sesso e composizione genetica predeterminata in risposta all'esigenza del mercato;
- contribuire ad aumentare la fertilità;
- controllare la diffusione di malattie legate alla riproduzione o sessualmente trasmissibili.

1.1 TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA

Nei bovini le tecniche di riproduzione assistita (ART) possono essere definite come pratiche, di manipolazione degli eventi e/o delle strutture legate alla riproduzione, sviluppate con lo scopo di ottenere una gravidanza e da questa prole in salute (Velazquez, 2008). Queste tecnologie in generale, si applicano nelle fasi di ovulazione, fecondazione e sviluppo embrionale. Combinare diverse ART come OvumPickUp (OPU), la produzione embrionale in vitro e la vitrificazione per l'ET diretto sembra essere ulteriormente vantaggioso (Martinez, 2012).

Le ART maggiormente applicate nell'allevamento bovino e con il miglior successo sono:

- INSEMINAZIONE ARTIFICIALE (AI)
- MULTIPLE OVULATION AND EMBRYO TRANSFER (MOET)

- SESSAGGIO SEMINALE
- PRODUZIONE EMBRIONI IN VITRO (IVP)

1.1.1 Inseminazione Artificiale

L'inseminazione artificiale (AI) resta ancora il principale mezzo per il miglioramento delle qualità genetiche degli allevamenti. Combinare l'AI con la crioconservazione del seme ha permesso di massimizzare il potenziale riproduttivo di maschi pregiati eliminando i limiti portati dal tempo e dalla distanza e permettendo ad un singolo toro di generare approssimativamente 50000 discendenti in un anno. I metodi per la conservazione del seme hanno raggiunto livelli molto avanzati fornendo seme di ottima qualità per l'AI. Nonostante questo, ancora poco comprese sono le cause della perdita della fertilità del seme nelle fasi di congelamento e scongelamento (Rodriguez-Martinez, 2012). La deposizione del seme a livello di corpo uterino è la forma tradizionale di AI e porta ad un *tasso di gravidanza* del 55-60% (Velazquez, 2007). Ad oggi la deposizione del seme viene fatta anche a livello di corna uterine.

La variabilità nella fertilità dei tori è solo uno dei fattori che influenzano questa biotecnologia ma un test appurato sulla previsione di fertilità non è ancora stato sviluppato. Con l'uso di seme fresco la fertilità è paragonabile all'accoppiamento naturale (superiore all'80%) ma con il seme congelato questo indice rimane ancora poco superiore al 60% (Martinez, 2012). L'applicazione di un protocollo per la sincronizzazione degli estri è risultato utile per migliorare la gestione dell'AI, essendo il rivelamento dell'estro ancora problematico in alcuni contesti. Ancora migliore è l'Ovsynch, ovvero la sincronizzazione dell'ovulazione, che permette di agire efficacemente, anche senza la determinazione dell'estro e con fecondazioni programmate in un tempo stabilito. L'AI svolge un ruolo fondamentale anche nei programmi di *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET).

1.1.2 Superovulazione e Trasferimento Embrionale

Il contributo al progresso genetico per quanto riguarda la componente femminile si è ottenuto grazie a tecniche come l'*Embryo Transfer* (ET), per la raccolta di embrioni con metodiche non chirurgiche (*non-surgical embryo transfer*), la maturazione, la fertilizzazione e la coltura di oociti bovini in vitro. Gli embrioni congelati hanno poi permesso la diffusione globale di animali con elevato valore genetico (Faber et al., 2003). Nel 1951 è nato il primo vitello da ET chirurgico di un embrione di 5 giorni prelevato alla macellazione (Willett et al., 1951). Le prime procedure di ET prevedevano infatti la raccolta di embrioni da donatrici selezionate e il trasferimento in animali riceventi attraverso la chirurgia. Considerando i limiti pratici di questa tecnica, alla fine degli anni '70 si è passati ad applicare la tecnica non chirurgica (Wright, 1981). Il concetto di ovulazione multipla ed ET è stato invece introdotto alla fine degli anni '80. Uno dei vantaggi della superovulazione e trasferimento embrionale (MOET) è la riduzione dell'intervallo generazionale che ha permesso di testare tori non più dai dati produttivi delle figlie ma delle sorelle (Smith e Ruane, 1987). Con questo approccio è possibile testare geneticamente un toro in tre anni e mezzo, rispetto ai cinque e mezzo usando gli schemi dei tradizionali *progeny test*. Fondamentale in questa tecnica è il ruolo della donatrice ovvero il soggetto selezionato geneticamente che è sottoposto a superovulazione per la produzione di numerosi oociti. Inizialmente tra i prodotti per la superovulazione si usava l'eCG poi surclassata dagli estratti pituitari come l'FSH e LH. Questi prodotti, per la loro breve emivita, richiedono iniezioni multiple e per il loro utilizzo esistono diversi protocolli. Al momento dell'estro la donatrice viene inseminata due volte: a 12 e 24 ore dall'insorgenza dell'estro. Sette giorni dopo si esegue il *flushing*, un lavaggio a livello uterino con lo scopo di recuperare gli eventuali embrioni. Questi verranno analizzati e se ritenuti idonei saranno trasferiti nella bovina ricevente (preventivamente sincronizzata) altrimenti saranno congelati e crioconservati (Hasler, 2014; Mapletoft, 1985). Limiti di questa tecnica sono però il basso *tasso di gravidanza* e la risposta variabile delle donatrici alla superovulazione. Il tasso di gravidanza oscilla tra il 50-60% con migliori risultati dall'uso di embrioni non congelati e manze come riceventi.

1.1.3 Sessaggio Seminale

Il *Sexed Semen* o seme sessato ha permesso di ottenere prole di genere maschile o femminile a seconda delle esigenze. Dopo diversi anni di studi nel 1981 si è appurato che il contenuto preciso di DNA poteva essere misurato applicando la citometria a flusso. Questa ha permesso sia di differenziare, sia di quantificare gli spermatozoi contenenti cromosomi XX e quelli con cromosomi XY in modo tale da poterli poi utilizzare sia per l'AI che per l'IVF. L'uso di seme sessato nell'ambito dell'IVF è in notevole incremento ma molto si deve ancora fare per ottimizzarne l'impiego (Garner et al., 2008). Conoscere il sesso del seme risulta essere più vantaggioso economicamente del sessaggio embrionale permettendo una vera e propria selezione a priori rispetto alla sola identificazione. La predeterminazione del sesso della progenie con l'uso di questa tecnologia consente infatti di ottimizzare la produzione sia nel settore della carne che del latte. Limiti del seme sessato sono la maggior velocità di degradazione rispetto al seme normale (anche se la crioconservazione sembra aver ovviato a questo problema), la necessità di un management rigoroso e lunghi tempi richiesti per la selezione, il minor numero di embrioni trasferibili prodotti inseminando con questo seme le donatrici superovulate e il minor tasso di gravidanza per bovine in lattazione e manze (Velazquez, 2008).

1.1.4 Produzione Embrionale *In Vitro*

La nascita dei primi vitelli da embrioni interamente prodotti *in vitro* risale alla fine degli anni ottanta (Lu et al., 1988). La produzione *in vitro* di embrioni della specie bovina è una procedura efficiente e già nel 2003 contava più di 100 mila embrioni trasferiti, il 60% dei quali in Sud America (Betteridge, 2006).

Per la produzione di embrioni *in vitro* si devono applicare tre diversi passaggi:

- *in vitro* maturation (IVM)
- *in vitro* fertilization (IVF)
- *in vitro* culture (IVC)

Il prelievo degli oociti destinati alla maturazione *in vitro* può avvenire da differenti tipi di donatrici (per età e stato fisiologico) e con diverse metodiche.

Gli oociti possono esser prelevati *post mortem* o *in vitam*. *Post mortem* attraverso la raccolta di ovaie in sede di macellazione; *in vitam* con la tecnica dell'*ovum pick up* (OPU) che permette l'aspirazione ecoguidata del fluido follicolare e dell'oocita in esso contenuto. In ogni caso solo una minor parte degli oociti raccolti si svilupperà in embrioni vitali e ciò dipenderà da varie condizioni come lo stato di nutrizione della donatrice (Boland et al., 2001), lo stadio dell'oocita all'interno dell'onda follicolare al momento della raccolta, dal tipo di maturazione (in vivo o *in vitro*), dall'uso di seme fresco o congelato durante la fecondazione e dal tipo di macromolecole presenti durante l'IVC (Faber et al., 2003). I vantaggi dell'OPU sono svariati: è una metodica ripetibile e che può essere applicata direttamente in allevamento, senza particolari effetti collaterali (viene infatti impiegata senza trattare preventivamente le donatrici con le gonadotropine evitando così di provocare infertilità e altre patologie a seguito di ripetute superovulazioni). La flessibilità di questa tecnica invece è dovuta all'ampio intervallo temporale in cui può esser applicata: dai sei mesi di età fino al terzo mese di gravidanza e successivamente appena due-tre settimane dal momento del parto (Galli et al., 2003).

L'associazione della tecnica di OPU e IVP viene usata per produrre embrioni da bovine di alto valore genetico risultate infertili all'AI (*repeat breeding*) o non rispondenti alla superovulazione dei protocolli MOET o con ovidotto ostruito. Permette inoltre di ottenere prole da animali prepuberi e da bovine gravide riducendo così l'intervallo generazionale (Chaubal et al., 2005; Faber et al., 2003). Il trasferimento di embrioni prodotti *in vitro* mostra ancora un ridotto tasso di gravidanza rispetto agli embrioni prodotti *in vivo*. Vitelli nati grazie all'IVP risultano aver un più elevato peso alla nascita (*Large offspring syndrome*), un maggior periodo di gestazione, un aumento nell'incidenza degli aborti e un aumento delle anomalie congenite rispetto a quelli nati da AI e MOET (Van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000; Van Wagtenonk-de Leeuw, 2006) (Fig.1.1.4.1).

Figura 1.1.4.1. Efficienza in termini di numero di figli (su 100 ovociti immaturi) di diverse tecnologie riproduttive.

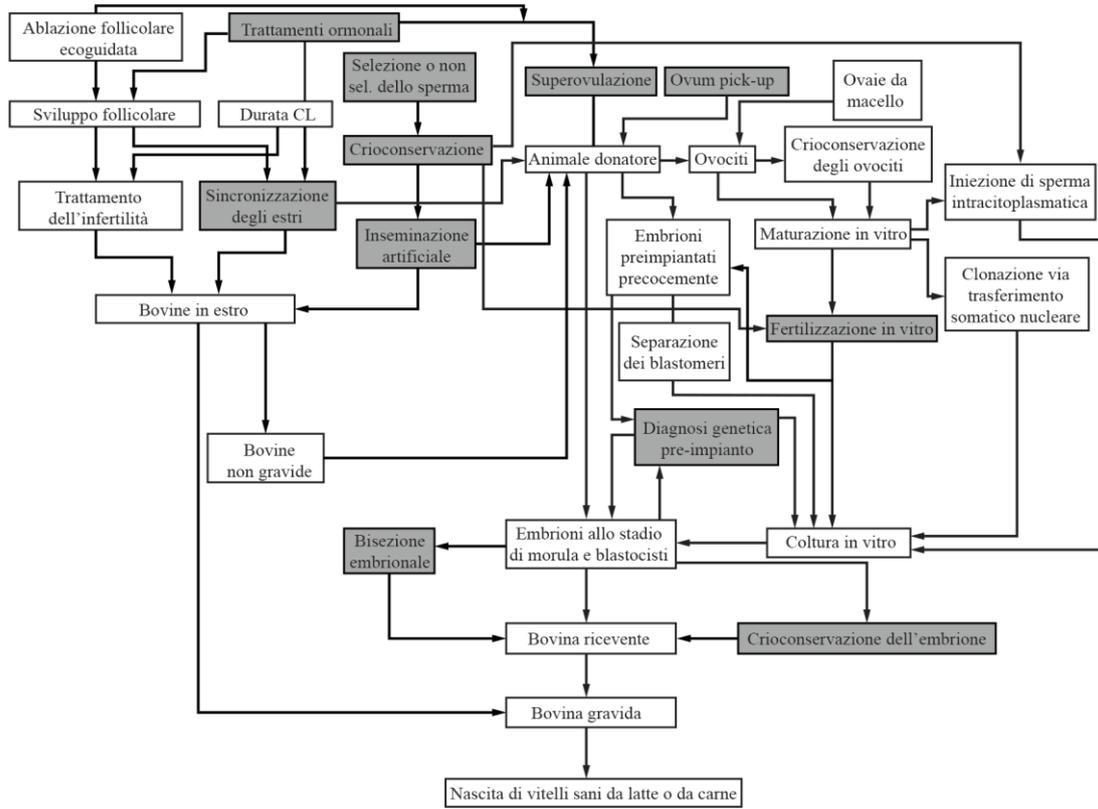
Technology	AI	MOET	OPU/IVP	Cloning/ transgenesis
Fertilized/zygotes	95	70	60	
Viable embryo at D7	90	60	25	20
Number of pregnancies D60	65	32	14	30
Number of live calves on the ground 1 week after birth	55	28	11	1
Estimated birth weight	Normal	+	++	+++
% Perinatal mortality	Normal	+	++	+++

Modificato da Van Wagtenonk-de Leeuw, 2006

Come affermato da Martinez (2012) appare chiara l'esigenza di ottimizzare sia la tecnica dell'OPU sia dell'IVM che ad oggi sembra essere il maggior ostacolo al successo dell'IVP sviluppando così questa alternativa alla tradizionale produzione embrionale. Diverse ART sono applicate nell'allevamento bovino (oltre a quelle descritte vanno citate la transgenesi e la clonazione).

Ad oggi l'AI resta il metodo con il maggior vantaggio economico (Velazquez, 2008). Testare il seme è poco invasivo, sostenibile economicamente e rimane un passaggio fondamentale per il successo di tutte le ART.

Figura 1.1.4.2. Applicazione delle ART nel bovino.



Modificato da Velazquez, 2008

1.2 L' ODISSEA DELLO SPERMATOZOO

Lo scopo ultimo dello spermatozoo, la singamia, può essere raggiunto solo con la cooperazione e la sincronizzazione da parte di molte cellule durante le fasi che precedono e seguono la fecondazione (Holt et al., 2004; Varner, 2015).

Gli spermatozoi devono andare incontro a notevoli rimodellamenti a livello sia di epididimo che di tratto genitale femminile allo scopo di poter raggiungere la capacità fecondante.

Varner (2015) stila una lista di questi eventi:

1. Perdita di molti organelli e citoplasma durante la fase di formazione nel testicolo e maturazione nell'epididimo;

2. Rimodellamento della cromatina spermatica a livello di epididimo;
3. Alternazione della membrana plasmatica a livello epididimale per fornire proteine importanti per la fecondazione;
4. Passaggio attraverso l'utero e la giunzione utero-tubarica;
5. Adesione alle cellule epiteliali oviduttali allo scopo di creare un reservoir spermatico;
6. Capacitazione;
7. Rilascio da parte delle cellule oviduttali e passaggio alla giunzione istmico-ampollare dell'ovidutto;
8. Penetrazione attraverso la matrice extracellulare del cumulo ooforo;
9. Legame con la zona pellucida;
10. Reazione acrosomiale;
11. Penetrazione della zona pellucida;
12. Legame e fusione con l'oolemma;
13. Dispersione dei contenuti nucleari;
14. Attivazione dell'oocita;
15. Formazione del pronucleo;
16. Organizzazione del fuso mitotico per il "ripristino" della diploidia;

Tutte queste fasi meritano attenzione e dovrebbero essere analizzate per la produzione di seme funzionale.

Con l'utilizzo dell'AI il seme viene rilasciato a livello di corpo uterino o a livello di corna uterine. Il sito in cui viene rilasciato il seme è risultato determinante per il riscontro di un maggior numero di spermatozoi a livello oviduttale, favorendo la tecnica di inseminazione profonda. Successivamente grazie alla motilità spermatica e alle contrazioni del miometrio gli spermatozoi vengono rapidamente trasportati a livello oviduttale prima di venir in contatto con l'oocita a livello di giunzione istmico-ampollare. Durante questo percorso, l'odissea dello spermatozoo, a livello di tratto riproduttivo femminile avverranno processi come la capacitazione e l'iperattivazione essenziali per ottenere la fertilizzazione dell'oocita (Suarez, 2008; Scott, 2000).

A livello di giunzione utero-tubarica (UTJ) e del tratto oviduttale definito istmo caudale si crea una sorta di serbatoio. Una spiegazione plausibile della funzione di questo serbatoio potrebbe essere quella di permettere solo a pochi spermatozoi di raggiungere l'oocita in un certo tempo riducendo così il rischio di polispermia. E'risultato inoltre

evidente che questo legame prolunga la vita motile degli spermatozoi (Suarez, 2008). La capacità di legame dello spermatozoo alle cellule oviduttali sembra esser determinata da fattori come molecole lectin-like presenti sulla superficie spermatica e frazioni contenenti carboidrati a livello di superficie epiteliale oviduttale. Nel bovino le proteine che rendono possibile l'adesione degli spermatozoi all'epitelio sono state identificate con nome di BSP (*bovine seminal plasma protein*) (Druart, 2012). Quattro sono le proteine leganti l'eparina identificate come appartenenti alla famiglia delle BSP e sono BSP-A1, BSP-A2, BSP-A3, and BSP-30 kd. Queste rappresentano il 70-86% del totale delle proteine contenute nel plasma seminale e vengono secrete dalle vescicole seminali (Juyena et Stelletta, 2012; Gwathmey et al., 2006). Polipeptidi e glicoproteine secrete da cellule dell'epitelio oviduttale sono risultate aver un effetto positivo per la capacitazione dello spermatozoo e per il legame di questo all'oocita (Coy et al., 2012).

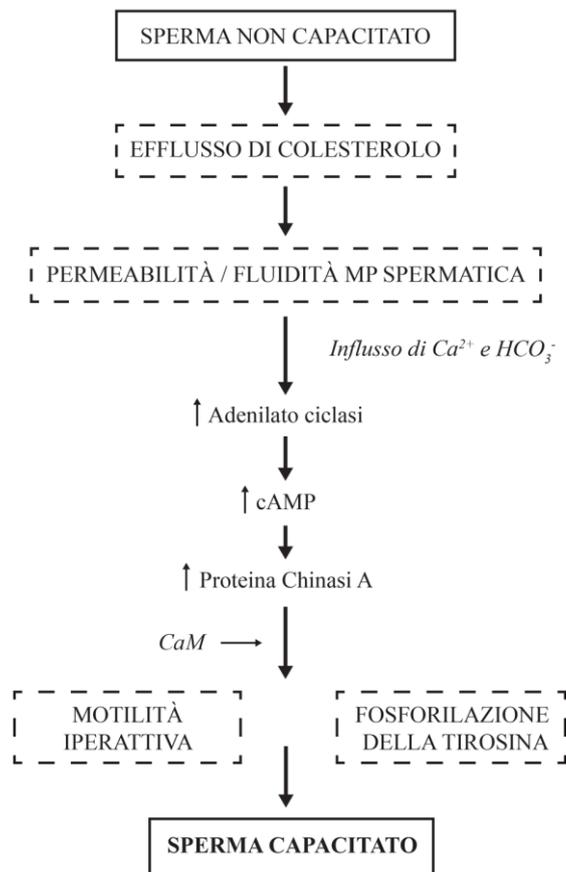
1.2.1 Capacitazione

Per capacitazione si intende quella serie di processi che avvengono nello spermatozoo durante il transito nel tratto genitale femminile e che gli permettono, dopo essersi slegato dall'epitelio oviduttale, di riconoscere l'oocita e legarsi con questo (Liu, 2015; Yanagimaki, 1994; Petrunkina et al., 2001).

La coordinazione e comunicazione tra spermatozoi e cellule oviduttali risulta quindi fondamentale per la riuscita della fecondazione (Apichela et Stelletta, 2012). Numerosi studi hanno dimostrato che il meccanismo che innesca la capacitazione è l'efflusso di colesterolo dalla membrana plasmatica dello spermatozoo. Questo efflusso comporta l'aumento della permeabilità e fluidità della membrana plasmatica portando a un aumento del calcio intracellulare (Abou-haila et Tulsiani, 2009) oltre che del bicarbonato. L'influsso di Ca^{2+} e HCO_3^- (con conseguente aumento del pH) porta all'attivazione dell'adenilato ciclasi spermatica SpAC (definita anche SACY, soluble adenylyl cyclase), enzima dedicato alla sintesi di cAMP (cyclic adenosine monophosphate). L'aumento di cAMP intracellulare stimola la protein kinase A (PKA) e altre chinasi incrementando così i processi di fosforilazione della tirosina indispensabili per la capacitazione (Galantino-Homer et al., 2004; Abou-haila et Tulsiani, 2009) (Fig.1.2.1.1). Il calcio inoltre interagisce con la calmodulina (CaM) contenuta in gran quantità nella regione della testa

e del flagello. La calmodulina grazie a diversi studi in vitro è risultata esser un fattore in grado di accelerare il processo di capacitazione aumentando l'attività dell'adenilato ciclasi e di tutti i processi che a questo conseguono.

Figura 1.2.1.1. Sequenza di eventi associati a iperattivazione e capacitazione.



Modificato da Abou-haila et Tulsiani, 2009

Nella capacitazione *in vitro* gli spermatozoi vengono incubati in un medium contenente elettroliti, sostanze energetiche come glucosio o piruvato e accettori del colesterolo (solitamente *bovine serum albumin* BSA, proteina presente in gran quantità anche nelle secrezioni del tratto riproduttore femminile). La fosforilazione della tirosina è fondamentale sia per la motilità spermatica che per il processo di iperattivazione.

1.2.2. Iperattivazione

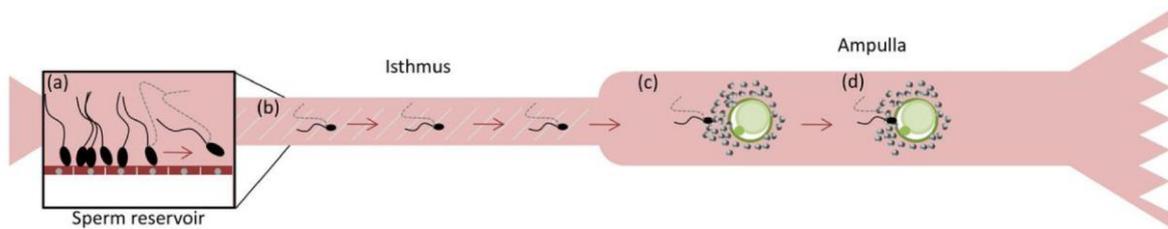
Yanagimachi (1970) è stato il primo a descrivere l'iperattivazione (HA) come un vigoroso movimento del flagello, di uno spermatozoo necessariamente capacitato, simile a un colpo di frusta (“*whiplash-like beating pattern*”). L'aumento della curva flagellare caratteristico di questa fase è probabilmente uno dei fattori predisponenti il rilascio, da parte degli spermatozoi, delle cellule oviduttali (Suarez et Pacey, 2006).

L'iperattivazione è determinante per la penetrazione della zona pellucida (ZP), permette il rilascio degli spermatozoi aderiti e stoccati a livello di epitelio oviduttale e li spinge attraverso il lume e la matrice del cumulo ooforo (Suarez, 2008).

Il PKA e un ulteriore aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, oltre che per la capacitazione, sono fondamentali per l'attivazione del battito flagellare e per determinare l'onda flagellare asimmetrica associata all'iperattivazione. L'aumento del Ca^{2+} intracellulare è dovuto per lo più alla presenza dei canali CatSper localizzati nella parte principale del flagello (Coy et al., 2012; Suarez, 2008). Rispetto a quanto riportato da Coy et al. (2012), il progesterone è risultato essere un altro componente essenziale, partecipando attivamente, insieme all'incremento del pH, all'attivazione dei canali CatSper.

Questi sono solo alcuni dei parametri per la riuscita della fecondazione; come affermato da Apichela e Stelletta (2012) si devono infatti considerare molti altri aspetti propri degli spermatozoi come le caratteristiche stesse del movimento flagellare, la sua differente velocità, l'equilibrio osmotico, l'integrità dei recettori chemio e termo-tattici, i peptidi di membrana. Fondamentale è inoltre la conoscenza dei fattori propri del fluido oviduttale, specie nel periodo periovulatorio (pH, temperatura, concentrazione di Ca^{2+} e bicarbonato) che partecipano alla riuscita di tutti questi eventi, modificando la fisiologia stessa degli spermatozoi.

Figura 1.2.2.1. Ruolo dell'iperattivazione spermatica indotta dall'ovidotto.



a) a livello di UTJ si ha il serbatoio spermatico b) lo spermatozoo a livello di istmo progredisce con battito flagellare asimmetrico fino al sito di fecondazione c) passaggio dello spermatozoo attraverso il cumulo ooforo d) penetrazione della zona pellucida. (Coy et al., 2012)

1.3 TEST FUNZIONALI PER LA VALUTAZIONE DEL SEME

Nonostante i molti anni di ricerca, i metodi di valutazione della qualità dello sperma continuano a fornire dati imprecisi sulla fertilità. Spermatozoi presenti nel liquido seminale manifestano notevole eterogeneità e possono presentare anomalie tali da renderli incapaci di prender parte alla fecondazione (assenza della componente acrosomiale e deformità flagellare etc.). Questa stessa eterogeneità dovrebbe essere maggiormente considerata per lo sviluppo di test di laboratorio più accurati (Holt et al., 2004).

L'approccio dei Centri Produttori di seme (*semen production centers, SPC*) è rivolto a fornire il maggior numero di dati correlabili con la buona riuscita della fecondazione e un alto tasso di concepimento.

L'analisi manuale con microscopio ottico è stata a lungo il metodo standard per la valutazione del seme ma i suoi limiti derivano dalla grande soggettività dell'esame e dai facili errori tecnici. Allo stesso modo l'uso del microscopio a fluorescenza per la valutazione dell'integrità di acrosoma, membrana e DNA spermatico è particolarmente lento come tecnica visto il numero limitato di spermatozoi analizzabile per campione. Per velocizzare l'analisi e per ottenere più informazioni sui diversi parametri contemporaneamente si è approdati al *Computer assisted sperm analysis (CASA)* per

quanto riguarda la valutazione della motilità e alla citometria a flusso per raccogliere informazioni in tempi più brevi su vitalità, attività mitocondriale, acrosoma e DNA oltre che lo stato di capacitazione degli spermatozoi (Vincent et al., 2012).

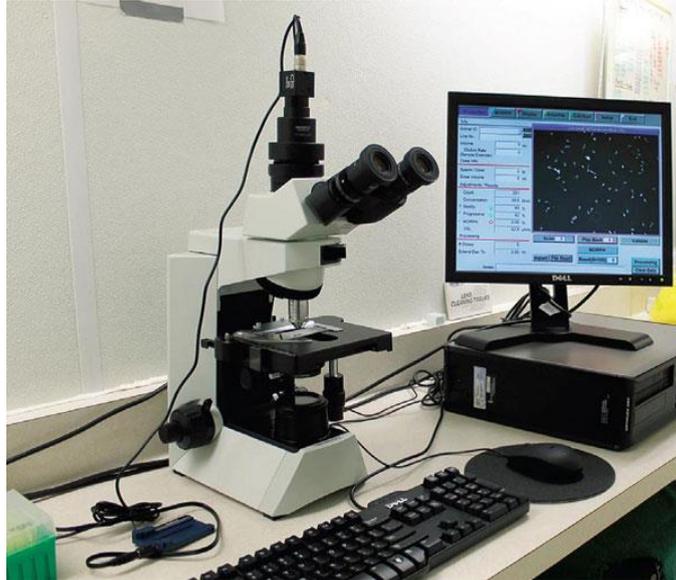
1.3.1 Computer Assisted Sperm Analysis (C.A.S.A)

Il CASA è una tecnologia sviluppata alla fine degli anni '80 che permette di studiare parametri fondamentali per la valutazione del seme (sia fresco che congelato), come la concentrazione, la morfologia, la motilità totale e progressiva e la velocità degli spermatozoi (Mortimer, 2015) con un'alta ripetibilità (Farrell et al., 1997; Amann et Wabersky, 2014).

Le componenti basilari di questa tecnologia sono un microscopio per la visualizzazione del campione, una camera digitale (telecamera) per catturare le immagini e un computer con un particolare software programmato per analizzare il movimento degli spermatozoi.

Il conteggio degli spermatozoi, viene effettuato attraverso l'elaborazione, da parte del software, delle resistenze elettriche dovute al passaggio delle particelle del campione (una alla volta) attraverso un campo elettrico. La rilevazione della motilità e della velocità degli spermatozoi invece è permessa attraverso lo studio delle immagini video registrate dal computer. La successione dei fotogrammi (*frames*) è analizzata dal software che seguendo parametri imposti dall'operatore, valuta le traiettorie, la velocità e la progressione degli spermatozoi (Boryshpolets et al., 2013).

Figura 1.3.1.1: Computer Assisted Semen Analysis (CASA)



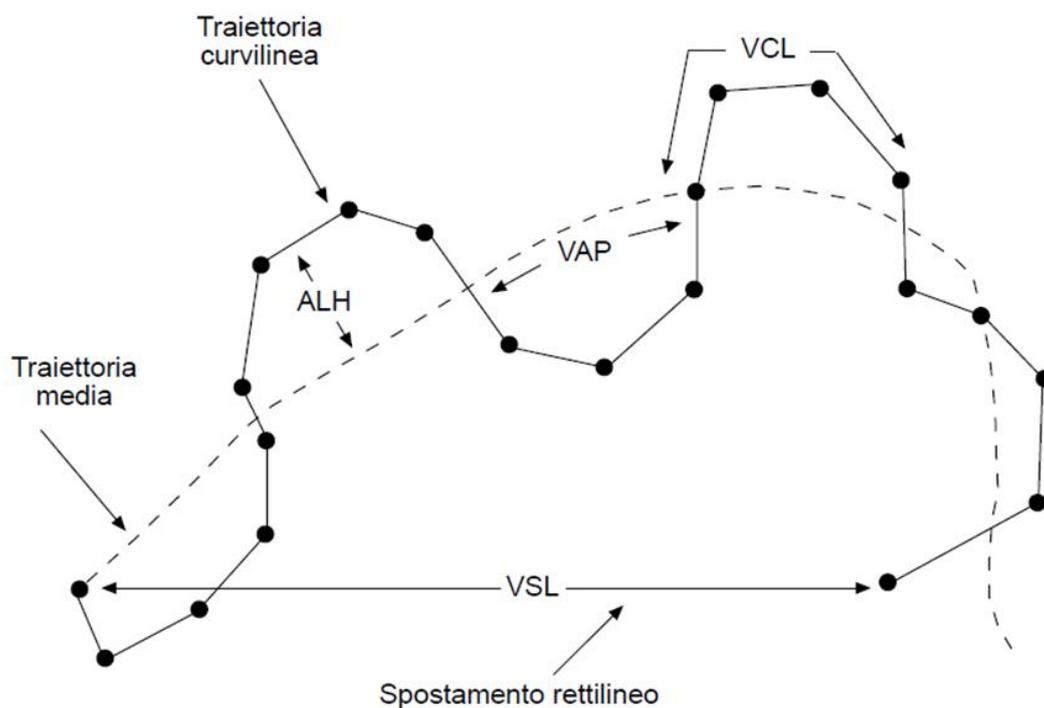
I principali parametri considerati nel CASA sono:

- VCL (*velocity curved line*) o velocità curvilinea ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua attuale traiettoria curvilinea, come rilevata bidimensionalmente al microscopio.
- VSL (*velocity straight line*) o velocità rettilinea ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la linea retta che unisce la sua posizione iniziale con quella finale.
- VAP (*average path velocity*) o velocità intermedia ($\mu\text{m/s}$). Velocità media di una testa di spermatozoo lungo la sua traiettoria intermedia nell'unità di tempo. Questa traiettoria viene dedotta per mezzo di algoritmi inseriti nel sistema CASA.
- ALH (*amplitude of lateral displacement of the sperm head*) o ampiezza dello spostamento laterale della testa (μm) dello spermatozoo dalla sua traiettoria media. Può essere espressa come valore massimo o valore medio dello spostamento. Diversi strumenti CASA calcolano l'ALH mediante differenti algoritmi, i valori ottenuti pertanto non sono del tutto comparabili.
- LIN (*linearity*) o linearità (%). La linearità di una traiettoria curvilinea, VSL/VCL .
- WOB o oscillazione (%). Misura dell'oscillazione della traiettoria reale da quella intermedia, VAP/VCL .

- STR (*straightness*) o rettilineità (%). Linearità della traiettoria intermedia, VSL/VAP.
- BCF (*beat cross frequency*) o frequenza del battito (battiti/s) o (Hz). Frequenza media con cui la traiettoria curvilinea dello spermatozoo incrocia quella intermedia.

I diversi sistemi CASA utilizzano differenti algoritmi per calcolare le variabili di movimento. Attualmente non si ha ancora un sistema definito per comparare i dati determinati dai differenti sistemi CASA (Fréour et al., 2010; Massany et al., 2008).

Figura 1.3.1.2. Terminologia per le variabili analizzate dal sistema CASA.



I limiti di questa tecnica riguardano sia i protocolli di preparazione del campione che la calibrazione dello strumento; anche la temperatura a cui viene svolta l'analisi e la concentrazione di spermatozoi del campione oltre al tipo di extender utilizzato possono alterare i risultati.

Fissare dei parametri e condizioni standard è fondamentale per ottenere una correlazione ripetibile e valida tra CASA e la fertilità (Vincent, 2012; Massanyi et al., 2008).

1.3.2 Citometria a Flusso

La citofluorimetria o citometria a flusso è una metodica di laboratorio automatica e multiparametrica che permette di valutare caratteristiche citologiche e biochimiche di cellule in sospensione all'interno di un fluido di trasporto, che interseca ad alta velocità una sorgente di eccitazione composta da uno o più laser. Con questa tecnica è possibile rilevare informazioni sul numero e sulla vitalità degli spermatozoi, sull'integrità di membrana, sull'attività mitocondriale, sul DNA e sull'influsso di Calcio (Vincent et al., 2012; Gillan et al., 2005). Se le particelle sono state marcate con una o più sostanze fluorescenti (fluorocromi), al momento del contatto con la fonte elettromagnetica eccitante, emanano fotoni con diversa intensità luminosa in base alle caratteristiche cellulari. Queste emissioni, o meglio fluorescenze, vengono poi acquisite ed amplificate dai fotomoltiplicatori e analizzate da specifici software (Morrell, 1991). Tra le colorazioni più utilizzate vi sono la carbossifluorescina diacetato (CFDA) e lo ioduro di propidio (IP); la prima assume colorazione verde e viene trattenuta all'interno delle membrane plasmatiche integre, il secondo viene trattenuto all'interno delle membrane plasmatiche alterate e colora il nucleo degli spermatozoi di rosso (Galli et al., 1998).

Questa tecnica permette di ottenere un gran numero di informazioni sugli spermatozoi in un tempo contenuto ma ha anche dei grossi limiti derivati dall'elevato costo e ingombro delle strumentazioni e dalla necessità di aver a disposizione personale specializzato.

1.3.3 Prove *In Vitro* di Adesione Spermatica alla Zona Pellucida e alle Cellule Oviduttali

La capacità fecondante di un seme risulta dalle sue caratteristiche quali e quantitative ma anche dalla sua effettiva capacità di intraprendere tutti quei processi che gli permetteranno poi di interagire con l'oocita. Il numero di spermatozoi effettivamente fecondanti è solo una piccola percentuale di quelli ritenuti validi da analisi di morfologia e motilità, ecco perché spesso gli esiti risultano controversi rispetto all'effettivo tasso di gestazione. Appare chiara l'utilità di sviluppare test per l'analisi di fasi sempre più specifiche della vita spermatica così da individuare e selezionare l'effettivo numero di spermatozoi fecondanti.

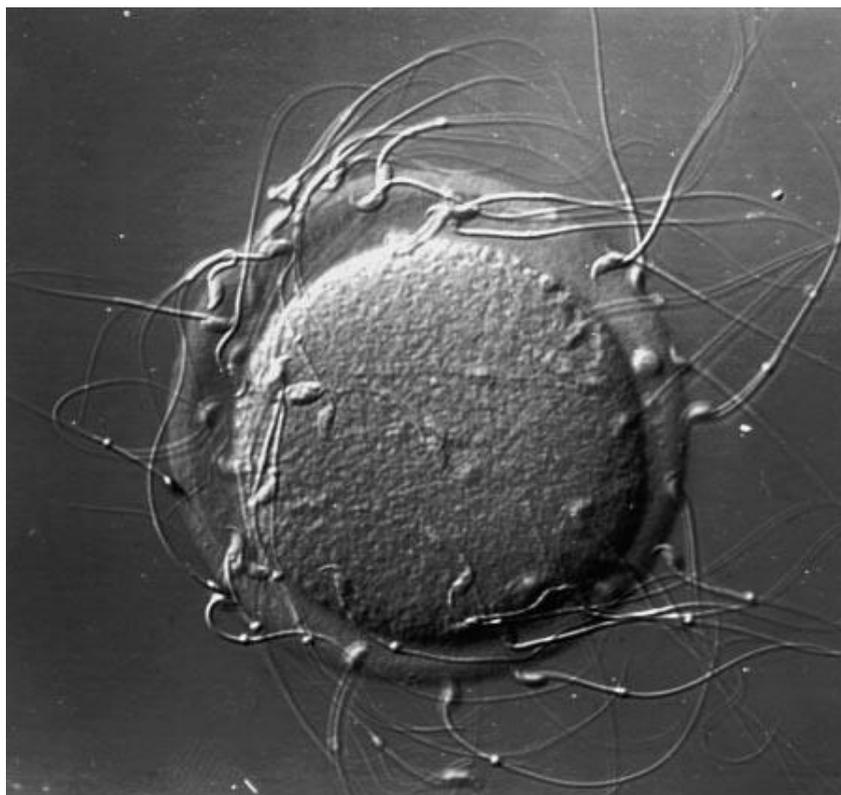
Una delle fasi che devono venir indagate è l'adesione alla zona pellucida da parte dello spermatozoo essendo questa la prima fase del processo di fecondazione (Wassarman, 1999) (Fig.1.3.3.1). Benché questo test sia utile per la produzione *in vitro* di embrioni (Apichela et Stelletta, 2012) è risultato però aver risultati controversi per lo più negli animali domestici mostrando che la capacità degli spermatozoi di legarsi *in vitro* alla zona pellucida non è correlato alla fertilità effettiva o alla capacità di legarsi agli oociti in vivo (Braundmeier, 2002).

Per la scarsa attendibilità di questo test si è visto necessario elaborare e affiancare a questo un ulteriore test che andasse a valutare le fasi precedenti della vita e della selezione spermatica già a livello oviduttale, sede in cui si sviluppano le sue capacità fecondanti (Apichela et Stelletta, 2012). Questo è il test di adesione spermatica alle cellule oviduttali.

In questo test l'interazione tra spermatozoi e ovidutto viene valutata attraverso l'incubazione in co-coltura degli spermatozoi su espianiti di cellule dell'epitelio oviduttale, con lo scopo di calcolare il numero di spermatozoi aderiti per unità di superficie, quello che viene detto Indice di adesione (IA) e creare una correlazione tra questo indice e la fertilità di campo (Petrunkina et al., 2001). Notevoli però sono le differenze nei protocolli di questi test. Infatti vengono valutati diversi tratti dell'ovidotto (istmo o ampolla) nelle differenti fasi del ciclo estrale; espianiti di tessuto oviduttale, di vescicole di cellule epiteliali, di monostrati cellulari o di membrane apicali di cellule dell'epitelio oviduttale. L'epitelio oviduttale stesso viene ottenuto con metodologie che

spaziano dalla raschiatura al taglio o con l'utilizzo di cellule precedentemente coltivate *in vitro*. Benché negli studi di Lefebvre et al., (1995) alcune di queste variabili (età, segmento oviduttale, fasi del ciclo estrale) siano parse non inficiare molto sull'adesione spermatica (Apichela e Stelletta, 2012; Petrunkina et al., 2001) altri studi hanno dimostrato che l'adesione degli spermatozoi è maggiore a livello di istmo piuttosto che ampolla (Bosch et Wright, 2005) e che le dimensioni dell'espianto possono influire sugli indici di adesione (Apichela et al., 2009). Mancano inoltre studi che dimostrino la validità di questo test in campo comparando il comportamento degli spermatozoi *in vitro* e la loro effettiva capacità fertilizzante in vivo.

Figura 1.3.3.1. Adesione spermatica alla zona pellucida.

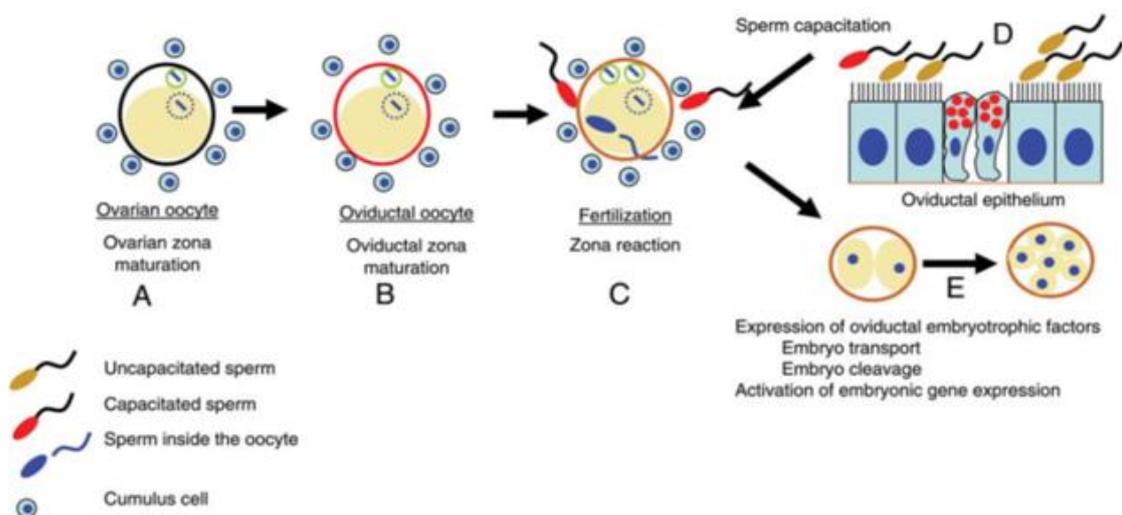


Modificato da Wassarman, 1999

1.4 ANATOMIA DELL' OVIDOTTO

L'ovidotto (detto anche tuba di Falloppio o salpinge) è la struttura anatomica sottile e tortuosa dove avviene la fecondazione. Si divide in quattro regioni procedendo dal polo anteriore dell'ovaio al corno uterino omolaterale: infundibolo, ampolla, istmo e giunzione utero- tubarica. L'infundibolo è la porzione deputata al trasporto dell'oocita dopo l'ovulazione, l'ampolla è la regione tubulare dilatata dell'ovidutto dove la fecondazione è completata, l'istmo è la parte adibita al trasporto del gamete e dell'embrione in cui si ha il serbatoio spermatico (Bosch et Wright, 2005). La mucosa dell'ovidotto presenta pieghe primarie e secondarie di diversa altezza e orientamento e tra queste si trova un sistema complesso di cripte, tasche e scanalature. L'epitelio è per lo più formato da due tipi cellulari: cellule ciliate e non ciliate (cellule secretorie). Durante le diverse fasi del ciclo estrale e nei diversi tratti oviduttali distribuzione e morfologia di queste cellule variano (Mondejar et al., 2012). Il successo riproduttivo dipende dalla funzionalità dell'ovidotto in quanto la conservazione, la maturazione e la fertilizzazione del gamete avvengono in questa sede (Cerny et al., 2015).

Figura 1.4.1. Si mostrano le modificazioni che avvengono a livello dei diversi tratti dell'ovidotto.



A) durante l'ovulazione l'oocita , ancora in metafase II ,viene rilasciato a livello di infundibolo B) a livello di ampolla si ha la maturazione (indurimento) della ZP , mediata da OVGP1 C) nella giunzione istmico-ampollare lo spz riduce la possibilità di legarsi all'oocita D) l'istmo in diverse specie risulta essere il tratto in cui avviene la fine della capacitazione si ha il serbatoio spermatico. E) l'istmo è anche la regione attraversata dall'embrione prima del suo arrivo all'utero e in cui vengono prodotti fattori embriotrofici (Aviles et al., 2010).

1.4.1 Fluido Oviduttale

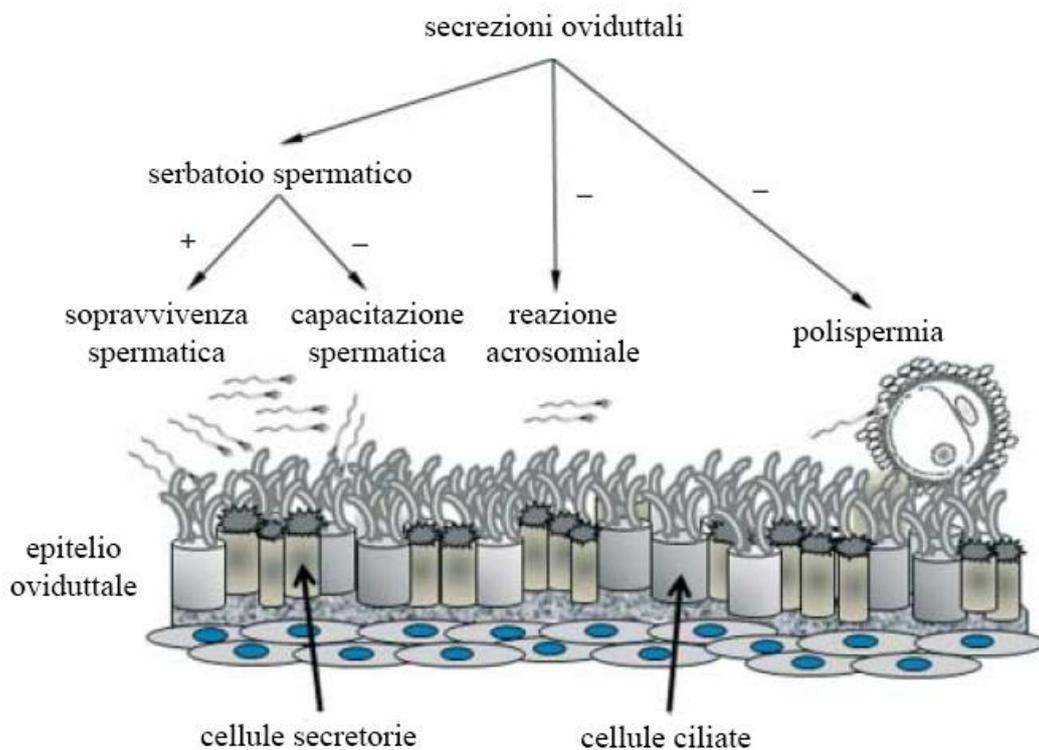
Il fluido oviduttale (**ODF**) è composto in parte da elementi trasudati dal siero, attraverso i vasi oviduttali e in parte da secrezioni delle cellule dell'epitelio oviduttale (Bosch et Wright, 2005). L'ODF è un fluido dinamico in quanto variabile nelle sue componenti rispetto alle diverse regioni da cui viene prodotto, al diverso periodo del ciclo estrale, alla presenza o meno del gamete in sede oviduttale (Aviles et al., 2010).

Tra i componenti dell'OFD si hanno:

- Gli elettroliti come il magnesio (Mg), il cloro (Cl), il potassio (K), il sodio (Na) e il calcio (Ca);
- I substrati energetici per lo più glucosio e piruvato (in minor quantità anche lattato e saccarosio), fondamentali per il nutrimento degli spermatozoi, dell'oocita e dell'embrione nel transito oviduttale;
- I lipidi come colesterolo e fosfolipidi, responsabili della stabilità di membrana e importanti per il successo della capacitazione spermatica. La quantità di colesterolo è risultata essere maggiore nell'istmo rispetto all'ampolla e soprattutto in fase luteinica; minore in ampolla durante la fase non luteale. Al contrario i fosfolipidi, con la loro funzione destabilizzante verso le membrane plasmatiche, sono risultate maggiori in fase non luteale. Questi valori sembrano confermare la partecipazione di questi (rispettivamente diminuendo e aumentando) ai processi di capacitazione e reazione acrosomiale (Grippio et al., 1994; Ghersevich et al., 2015) (Fig.1.4.1.1).
- Le proteine, di natura sierica o prodotte dalle cellule secretorie dell'ovidotto. L'albumina sierica bovina (BSA) è la maggior componente proteica dell'OFD e

ha il ruolo fondamentale di rimuovere il colesterolo dalla membrana plasmatica degli spermatozoi, permettendo così l'inizio della capacitazione. Tra le glicoproteine si ha l'Oviduct-specific glycoprotein (OVGP1), proteina che modifica la ZP. Tra gli enzimi, fondamentale è la glicosidasi che interviene nella modificazione delle glicoproteine della zona pellucida (oltre che quelle della membrana delle cellule epiteliali e spermatiche) favorendo così il legame dello spermatozoo alla zona pellucida oltre che all'ovidotto. L'attività di questo enzima è inoltre risultata diversa nelle varie fasi del ciclo estrale (Ghersevich et al., 2015).

Figura 1.4.1.1. Effetti delle secrezioni oviduttali sul gamete.

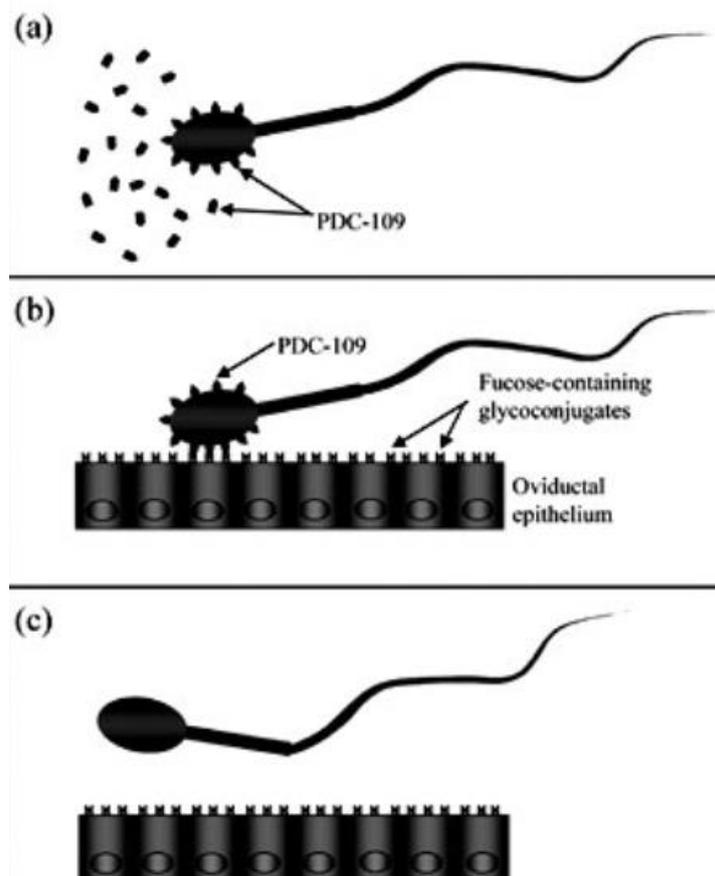


Modificato da Ghersevich et al., 2015

1.4.2 Interazione tra Sperma e Fluido Oviduttale

Molti degli eventi fondamentali per la riuscita della fecondazione avvengono a livello oviduttale. Il legame tra sperma e ovidotto è un processo reversibile che sembra coinvolgere frazioni di oligosaccaridi (fucosio) presenti sulla membrana cellulare dell'epitelio oviduttale e una lectina Ca^{2+} -dipendente disposta sulla superficie spermatica (PDC-109) appartenente alle BSP e secreta dalle vescicole seminali (Boilard et al., 2002; Bosch et Wright, 2005) (Fig.1.4.2.1).

Figura 1.4.2.1. Rappresentazione grafica dell'interazione spermatozoi-ovidotto.



a) *PDC-109 associata alla membrana plasmatica dello spermatozoo; b) nell'ovidutto PDC-19 si lega ai residui fucosilati presenti sulla membrana apicale delle cellule epiteliali oviduttali (OEC); c) la perdita, dalla superficie spermatica, o la modificazione di PDC-109 associata con la capacitazione facilitano il rilascio degli spermatozoi dal reservoir (Bosch et Wright, 2005).*

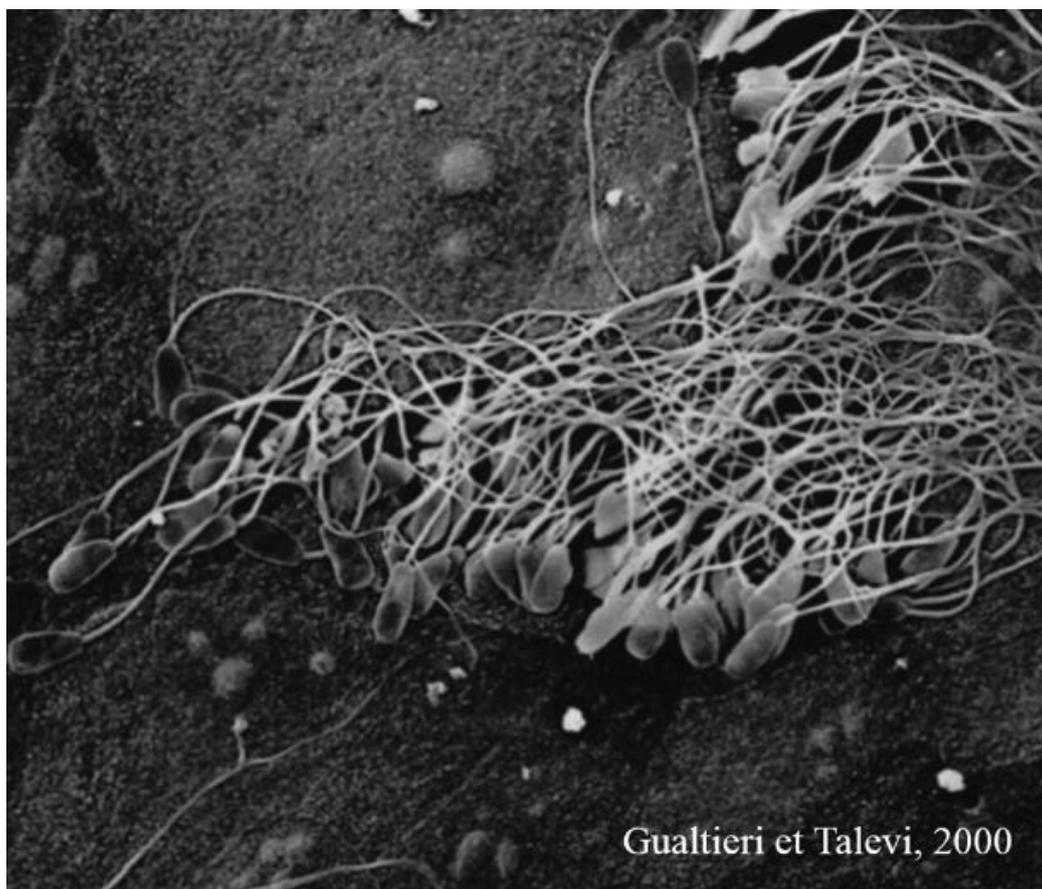
Le secrezioni oviduttali e il legame degli spermatozoi alle cellule oviduttali sono indispensabili per il mantenimento della fertilità spermatica. Diversi studi infatti hanno evidenziato modifiche nella fisiologia spermatica successivi all'interazione di questi con il fluido oviduttale. Si sono dimostrati cambiamenti a livello di membrana spermatica, aumento della motilità e dell'abilità fertilizzante favorendo l'induzione della reazione acrosomiale (Boilard et al., 2002; Abe et al., 1995; Petrunkina et al., 2001).

Dallo studio di Gualtieri e Talevi (2000) è emerso che:

- solo spermatozoi con acrosoma intatto aderivano alle *bovine oviductal epithelial cells* (BOEC);
- l'acrosoma degli spermatozoi legati viene conservato intatto;
- il rilascio degli spermatozoi probabilmente è dovuto a modifiche della superficie innescate dalla capacitazione.

Gli spermatozoi adesi appaiono essere quindi ancora non sottoposti a capacitazione, privi di goccia citoplasmatica, con morfologia migliore, con basso contenuto di Ca²⁺ intracellulare e con processi di fosforilazione della tirosina inattivati. L'adesione all'epitelio sembra essa stessa un mezzo di selezione spermatica (Apichela et Stelletta, 2012) in grado di far progredire solo gli spermatozoi di buona capacità fertilizzante.

Figura 1.4.2.2. Spermatozoi legati al tratto istmico.



Prove *in vitro* hanno dimostrato che la capacitazione spermatica può esser favorita creando una co-coltura di spermatozoi e un monostrato di cellule oviduttali (*oviduct epithelial cell monolayers: OECM*) (Abe et Hoshi, 1997).

Le componenti biochimiche presenti a livello di OAPM (*oviduct epithelial cell apical plasma membrane*), capaci di modulare le diverse fasi utili per incrementare la capacità fecondante del seme, sono ancora poco conosciute. Questo anche per il limite imposto dal CASA nell'analisi di seme incubato con cellule oviduttali. Tra quelle conosciute si citano l'oviduttina, glicoproteina secreta durante la fase follicolare del ciclo estrale e capace di conservare gli spermatozoi motili (Abe et al., 1995). Il rilascio degli spermatozoi adesi alle cellule oviduttali è mediato da cambiamenti della membrana dello spermatozoo probabilmente riferiti al processo della capacitazione. Come riferito da Talevi et Gualtieri (2001) glicoconiugati solfati quali l'eparina e il fucoinato sono risultati essere sia potenti inibitori dell'adesione che induttori del rilascio di spermatozoi adesi a cellule oviduttali *in vitro*.

SCOPO DELLA TESI

Con questo lavoro si è sviluppato un protocollo di test di adesione degli spermatozoi ad espianti di cellule oviduttali e si è stimato l'attendibilità. Si è elaborato un test economico, ripetibile e facilmente applicabile in campo e in un tempo contenuto.

2. MATERIALI E METODI

Il lavoro per lo sviluppo di un protocollo di test di adesione spermatica alle cellule oviduttali è stato elaborato in tre fasi.

La prima fase ha previsto l'individuazione di una metodologia semplice ed economicamente sostenibile per testare le capacità di adesione di spermatozoi bovini scongelati ad espunti di cellule oviduttali utilizzando le informazioni ottenute in letteratura e considerando l'uso del microscopio ottico.

La seconda fase ha analizzato il seme di tori con fertilità di campo nota con il test elaborato nella fase precedente, rapportando i parametri ricevuti dall'Associazione Nazionale Allevatori Frisone Italiana (ANAFI) con quelli riscontrati dal test.

La terza applica il test d'adesione a seme di tori Burlini con fertilità di campo non nota; per questa razza infatti risulta complicato ottenere dati dal conception rate in campo in quanto razza in via d'estinzione.

2.1 FASE DI SVILUPPO DEL TEST

Per lo sviluppo del test ci si è basati su dati reperibili in letteratura procedendo poi alla selezione solo di quelli che erano più attinenti alle caratteristiche ricercate per il nostro test. Per le diverse prove sono state prelevate ovaie di bovine macellate subito prima della raccolta degli ovidotti. Non si è tenuto conto dei diversi stadi del ciclo estrale ma si sono escluse dal campionamento le bovine affette da evidenti patologie uterine (metriti, salpingiti). Le ovaie raccolte al Macello Fratelli Tosetto di Campo San Martino sono state trasportate al laboratorio di Ostetricia del Dipartimento MAPS immersi in soluzione fisiologica a temperatura ambiente (20-22° circa), per un tempo di trasporto di circa 45 minuti. Sotto cappa biologica gli ovidotti sono stati isolati dal mesosalpinge, ripuliti dal tessuto circostante per ridurre il rischio di contaminazione della coltura da parte di cellule non epiteliali e sono stati incisi longitudinalmente con lama di bisturi (n. 11) in modo da esporre la mucosa (Fig.2.1.1). Con visione a stereomicroscopio (NIKON SA6000) è stato prelevato l'espunto di cellule oviduttali della parte istmica, sezionando una porzione di

mucosa pari a circa 0,1 mm x 1 mm. La parte di mucosa prelevata è stata poi disposta su un vetrino e instillata con 50 microlitri di medium. Sono stati provati in via preliminare diversi tipi di medium e tempo di incubazione in atmosfera controllata (5% CO₂, 98 % umidità) (Heraeus HeraCell). I sei protocolli provati in questa prima fase vengono così schematizzati:

- PBS - 10 minuti;
- h-TALP - 10 minuti;
- PBS - 20 minuti;
- h-TALP - 20 minuti;
- PBS - 30 minuti;
- h- TALP - 30 minuti.

Figura 2.1.1. Ovidotto bovino prima e dopo la separazione dal mesosalpinge.



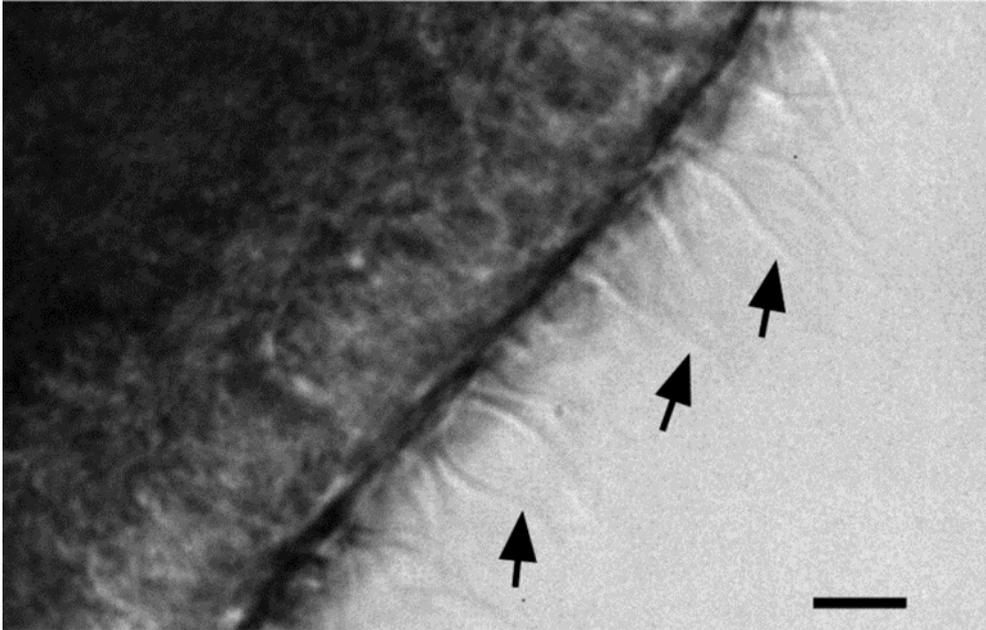
I due medium presi in considerazione in questo studio sono:

- PBS 1X (“*Phosphate buffered saline*”, o in italiano “tampono fosfato salino”) è una soluzione salina contenente Cloruro di Sodio, Sodio Fosfato e Potassio Fosfato ed è una sorta di soluzione fisiologica, isotonica non tossica per le cellule che viene comunemente utilizzata nei laboratori di biochimica e biologia per lavare cellule, riequilibrare i campioni e preparare soluzioni. In questo studio è stato usato PBS Sigma 10g/ L.
- H-TALP (“*Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*”). Il protocollo per la preparazione di 100ml di soluzione è il seguente: Cloruro di Calcio: 310mg/L; HEPES (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico): 2383 mg/L; Cloruro di Magnesio: 81.32 mg/L; Cloruro di Potassio: 230.95 mg/L; Bicarbonato di Sodio: 2100mg/L; Cloruro di Sodio: 5850mg/L; L-lattato di Sodio (60%):3.68ml; Fosfato di Sodio:40,02mg/L. A questi sono stati aggiunti BSA (*Bovine Serum Albumin*): 300mg, Piruvato di sodio 1ml, Gentamicina 150µg.

Terminata l’incubazione con PBS o h-TALP, l’espianto è stato messo in contatto con il seme. È stato utilizzato un seme congelato in paillette da 0,5 ml contenenti ognuna 14 milioni di spermatozoi. Lo scongelamento è stato effettuato a 37° per 60 secondi e il seme successivamente è stato diviso in due aliquote da 0,25 ml l’una e diluito, con medium mantenuto a 37°, in rapporto 1:1. Al vetrino con l’espianto di cellule oviduttali sono stati aggiunti 5µl di seme diluito, contenente approssimativamente 35000 spermatozoi motili. Il vetrino è stato poi incubato per il tempo previsto dal protocollo considerato. Durante queste fasi son stati testati dieci campioni di seme, ognuno con le sei combinazioni di protocolli.

Successivamente è stata eseguita la lettura del vetrino mediante microscopio ottico (Olimpus CX41) e senza nessuna colorazione con magnificazione di 400 X. Per il conteggio si è considerato come campo leggibile quello in cui l’espianto di cellule oviduttali percorreva rettilineamente il diametro maggiore del campo visivo e contando esclusivamente gli spermatozoi ancora motili e adesi ad un solo lato dell’espianto cellulare. Per ogni vetrino son stati valutati tre campi ed è stata considerata la media dei tre conteggi (Fig.2.1.2).

Figura 2.1.2. Spermatozoi legati all'epitelio oviduttale.



Modificato da Ardon et al., 2016

2.2 ESECUZIONE DEL TEST SU SEME DI TORI CON FERTILITÀ DI CAMPO NOTA E CON TORI BURLINI

Raccolta dati

La collaborazione del Centro Tori Intermizoo è stata essenziale per l'esecuzione di questa fase. Sono stati raccolti i dati relativi a:

- indice ercr (*estimated relative conceptions rates*) con un valore che va da -5.00 per tori poco fertili a +5.00 per tori molto fertili (dati forniti dall'ANAFI);
- attendibilità dell'indice ercr maggiore dello 0,98;
- dati CASA (Hamilton-Thorne IVOS) delle cannuce usate per l'AI da cui è derivato l'indice ercr;
- dati di disponibilità di dosi inseminanti relative ai prelievi che hanno contribuito alla definizione dell'indice ercr;

I dati raccolti sono stati riportati in un unico file excel (Microsoft Excel, versione 14.6.7) e classificati in dipendenza dell'appartenenza delle seguenti classi di indice ercr:

- classe 1 (ercr > 1.00): tori ad alta fertilità;
- classe 2 (ercr -1/+1): tori a media fertilità;
- classe 3 (ercr <1.00): tori a bassa fertilità.

Test di adesione su tori con diversa classe di ercr

Da ognuna delle classi sono stati selezionati random cinque tori e per ogni toro sono state considerate tre dosi di seme appartenenti ai lotti di produzione che hanno contribuito alla definizione dell'ercr. Il medium ed il tempo di incubazione è stato scelto in dipendenza dei test preliminari. Sono state considerate 3 dosi di seme e per ognuna, dopo il contatto con 3 espianti oviduttali, sono stati contati gli spermatozoi adesi su 3 campi microscopici seguendo la procedura riportata nella fase preliminare.

Test di adesione su tori Burlini senza classe di ercr

Sono stati considerati 8 tori di razza Burlina (Fig. 2.2.1) inseriti nel programma BIONET del PSR misura 214H WP1. È stato applicato lo stesso protocollo dei tori con ercr e si è valutata la capacità di adesione ad espanti di cellule oviduttali.

Analisi descrittiva e statistica

Le prove relative all'uso dei diversi medium e dei diversi tempi di incubazione presentavano evidenti differenze quando si prendeva in considerazione 10 minuti di incubazione con una enorme variabilità dei risultati. Si sono quindi considerati soltanto il tempo di 20 minuti di incubazione e come medium il PBS perché più economicamente sostenibile.

I dati raccolti dal sistema CASA (MOT, PROG, VAP, VSL, ALH, LIN e STR) riferiti a singole sessioni di prelievo di seme, sono stati classificati in dipendenza delle classi di indice ercr. Inoltre i parametri di VCL e di DANCE sono stati calcolati con i fogli excel applicando le formule esistenti in letteratura. Sono stati calcolati gli scarti dalla media in termini di numero di DS per tutti i parametri CASA e derivati.

Per entrambi i gruppi di tori, con e senza ercr, seguendo la procedura GLM del software SIGMASTAT 2.03 è stata eseguita ANOVA per misure ripetute considerando come

variabile indipendente l'appartenenza alle classi di indice ercr e come variabili dipendenti il numero medio di spermatozoi adesi e tutti i parametri del CASA.

Figura 2.2.1: Toro di razza burlina.



3. RISULTATI

L'analisi ha rivelato che il tempo di incubazione di 10 minuti era soggetto ad un'ampia variabilità di risultati sia con l'uso di PBS sia con l'uso di h- TALP. L'uso di un'incubazione di 20 o 30 minuti garantiva dei risultati per lo più sovrapponibili utilizzando i due diversi medium.

La scelta dei tori di razza Frisona, per quanto riguarda la seconda fase dello studio, ha tenuto conto di un ampio background derivato dall'analisi di dati forniti da ANAFI e dati elaborati su questi tori attraverso l'analisi CASA.

Il parametro fondamentale è l'*Estimated Relative Conception Rate* (ERCR) che rappresenta l'effetto del toro sulla percentuale di non ritorni delle vacche inseminate espresso come differenza rispetto alla media della percentuale di non ritorno ottenuti con semi degli altri tori. Questo valore viene calcolato usando dati derivati dai controlli funzionali (*progeny test*) a disposizione dell'ANAFI (Gaviraghi et al., 2010).

I valori dei parametri cinetici dei tre gruppi di tori con diverso ercr sono riportati nella tabella n 3.1 e nel grafico 3.1.

L'approccio analitico che ha preso in considerazione lo scarto medio dalla media in termini di numero di deviazioni standard ha potuto identificare come la classe 1 di ercr presenta uno scarto positivo maggiore rispetto alle altre due classi per quanto riguarda il parametro MOT (%) e PROG (%). La classe 3 presenta i più alti positivi scarti dalla media per quanto riguarda i parametri VAP, VSL, STR, VCL e DANCE (Grafico 3.2).

Per quanto riguarda il test di adesione con seme di tori con indice ercr si è evidenziato una differenza significativa ($P < 0,001$) tra classi di ercr (Grafico 3.3 e tabella 3.1)

Tabella 3.1. Valori (media \pm DS) dei parametri di cinetica spermatica (CASA) dei 3 gruppi di indice ercr. Valori (media \pm e.s.m.) del numero di spermatozoi adesi ad espanti di cellule oviduttali. di tori Frisoni con classificazione di indice ercr (Classi di CR 1,2,3) e di tori Burlini.

	Tori con indice ercr			Tori con indice ercr e disponibilità dei lotti produttivi per il test di adesione			BURLINI
	1,00	2,00	3,00	1,00	2,00	3,00	
Numerosità *	24 (2766)	50 (6213)	18 (1458)	11 (1095)	27 (3511)	8 (659)	8
MOT	79,72 \pm 14,92	77,16 \pm 17,26	70,85 \pm 20,49	87,10 \pm 2,74	84,69 \pm 7,15	84,10 \pm 5,09	-
PROG	46,83 \pm 10,30	44,88 \pm 11,85	40,74 \pm 12,28	59,49 \pm 4,07	58,44 \pm 6,17	59,11 \pm 3,63	-
VAP	85,38 \pm 26,97	85,66 \pm 28,33	87,24 \pm 27,75	85,63 \pm 11,44	89,07 \pm 9,51	90,99 \pm 6,75	-
VSL	70,63 \pm 22,58	70,17 \pm 23,36	69,38 \pm 22,14	67,64 \pm 6,47	70,96 \pm 7,10	71,62 \pm 5,58	-
STR	75,33 \pm 23,28	74,19 \pm 23,89	72,92 \pm 22,50	73,5 \pm 34,20	74,57 \pm 6,64	74,83 \pm 5,90	-
LIN	46,51 \pm 14,77	45,16 \pm 14,97	43,96 \pm 14,00	44,59 \pm 2,93	44,93 \pm 4,49	45,27 \pm 4,43	-
ALH	6,24 \pm 1,40	6,17 \pm 1,84	6,20 \pm 1,87	6,34 \pm 0,71	6,24 \pm 0,76	6,36 \pm 0,53	-
VCL	152,44 \pm 14,89	156,08 \pm 15,79	158,73 \pm 18,03	152,23 \pm 17,25	158,13 \pm 9,02	159,10 \pm 14,98	-
DANCE	1006,20 \pm 176,52	1067,46 \pm 212,71	1082,55 \pm 226,58	991,23 \pm 188,62	991,13 \pm 153,37	1014,48 \pm 145	-
TEST DI ADESIONE **	-	-	-	26,22 \pm 2,34 (45)	17,91 \pm 1,44 (45)	12,64 \pm 1,68 (45)	15,21 \pm 1,14 (24)

Grafico 3.1. Valori dei parametri CASA dei 3 gruppi di tori con classificazione ercr.

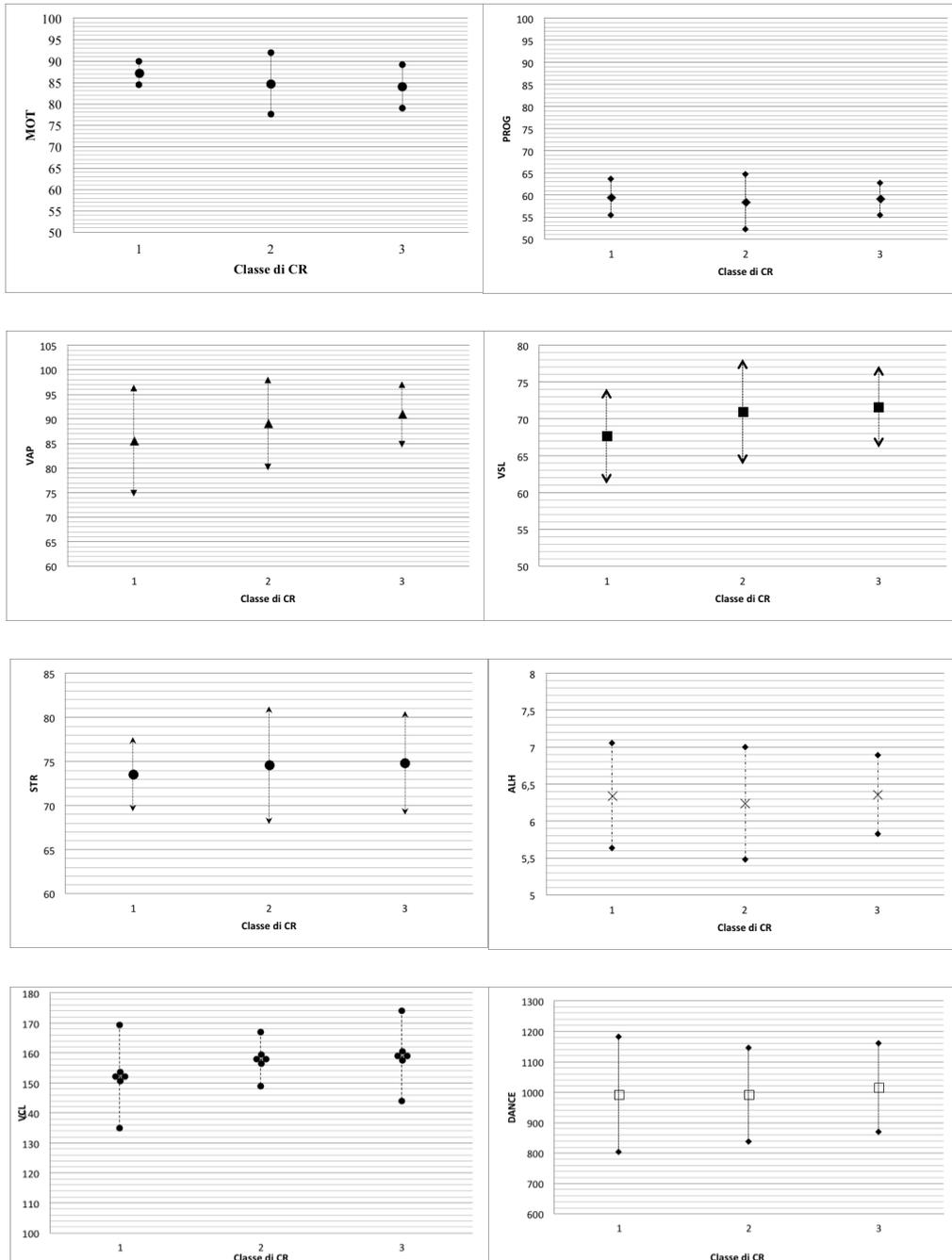


Grafico 3.2. Scarto di DS dalla media (N) dei gruppi di tori (1, 2, 3) selezionati per il test di adesione.

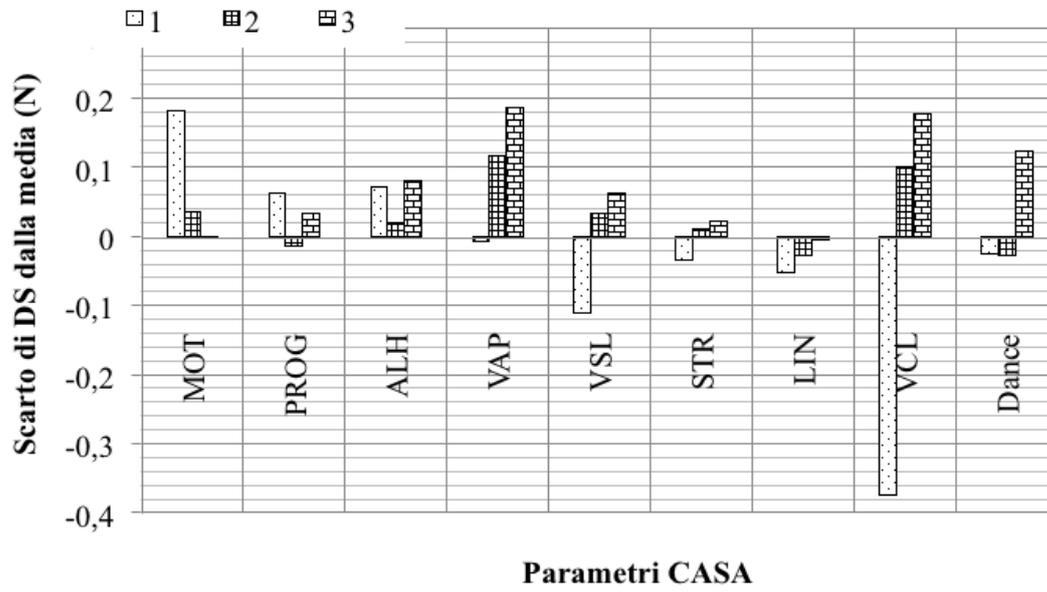
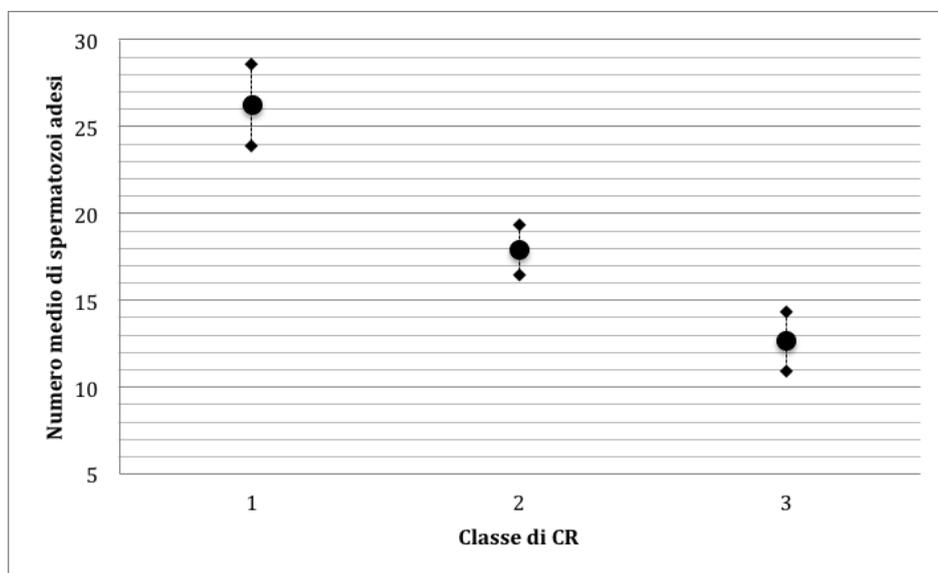
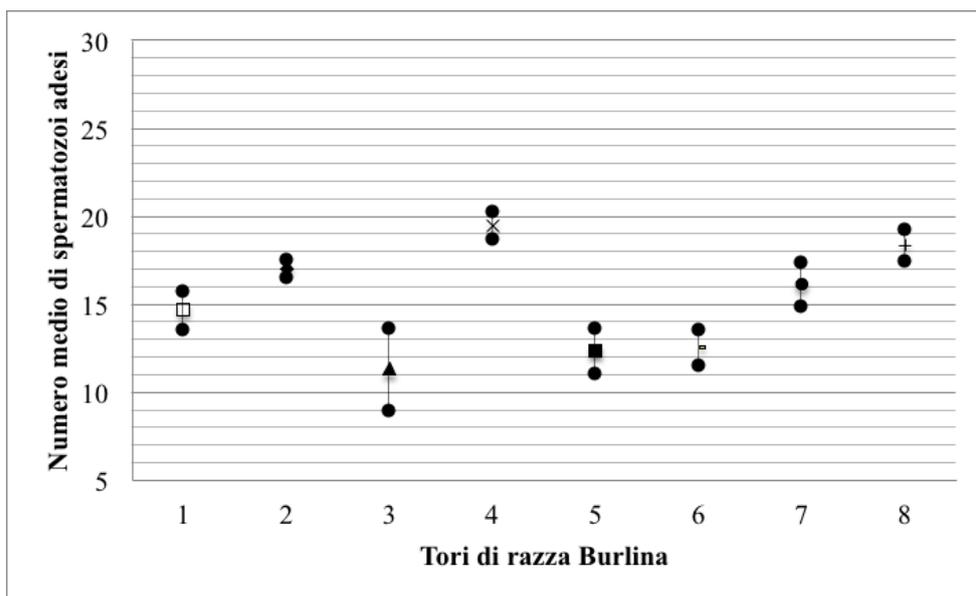


Grafico 3.3. Valori medi di spermatozoi adesi ad espianti di cellule oviduttali suddivisi per classi di indice ercr.



Il test d'adesione applicato sugli otto tori di razza Burlina ed eseguito su tre dosi di seme per ciascun toro ha dato i risultati riportati nel grafico 3.4.

Grafico 3.4. Valori del test di adesione di 8 tori Burlini con dati di fertilità di campo sconosciuti.

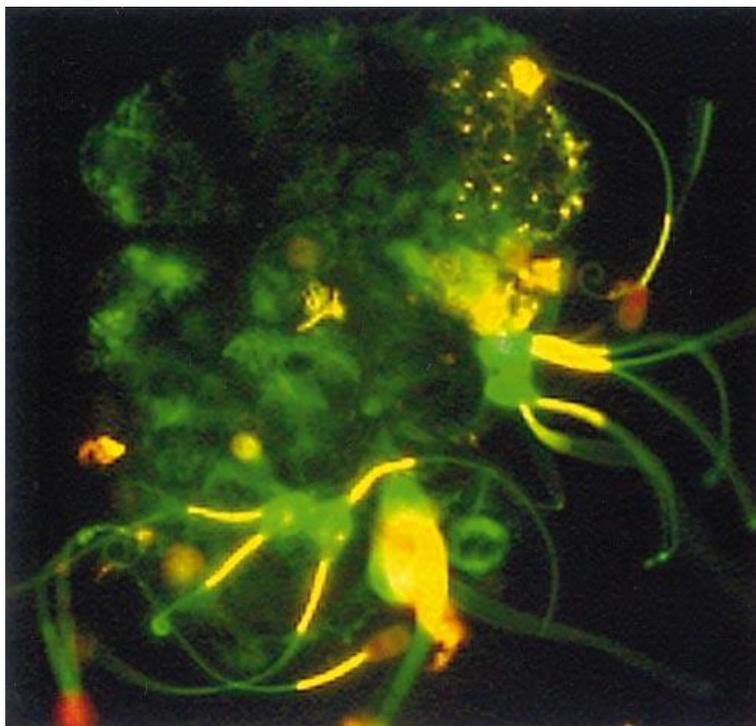


4. DISCUSSIONE

Le tecniche che prevedono lo studio degli spermatozoi per quanto riguarda gli aspetti morfologici sono solo in parte affidabili nello stimare la capacità fecondante del seme analizzato, infatti non tengono conto di tutte quelle modificazioni fondamentali che avvengono a livello oviduttale e che influenzano in modo decisivo sul processo di fecondazione.

De Pauw et al. già nel 2002 descrivono l'importanza dell'elaborazione di un test *in vitro* capace di predire la fertilità dei tori e quindi il *non-return rates* (NNT). Il NNT definisce la percentuale di vacche che non ritornano in calore dopo 56 giorni dall'inseminazione sul totale di vacche inseminate ed è fondamentale per stabilire la fertilità in campo. In base a queste necessità è stato quindi sviluppato un modello per quantificare gli spermatozoi adesi all'epitelio oviduttale attraverso microscopia a fluorescenza ed è stata avvalorata l'ipotesi che la densità spermatica rinvenuta possa essere usata per predire la fertilità del toro in vivo (Fig.4.1).

Figura 4.1. Adesione spermatica a un espianto di cellule oviduttali visto con microscopio a fluorescenza.



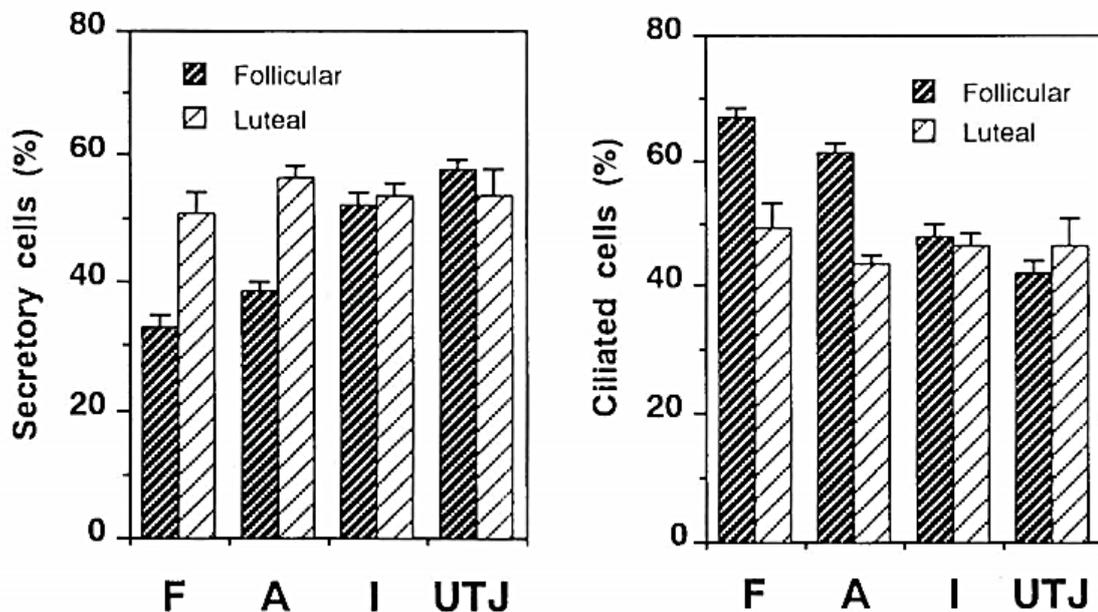
Modificato da De Pauw et al.,2002

Per quanto riguarda questo lavoro, attenendoci al nostro scopo, cioè trovare un test di adesione spermatica alle cellule oviduttali ripetibile, semplice da applicare ed economico, si è deciso di utilizzare per la visualizzazione del processo di adesione un microscopio ottico ovviando al costo ben più elevato e al processo ben più complicato richiesto dalla microscopia a fluorescenza.

La scelta di utilizzare l'espianto di cellule oviduttali è stata fatta con lo scopo di mantenere il più possibile le caratteristiche morfologiche dell'ovidutto così da poter esser più vicini a ciò che avviene in vivo. Inoltre è stato dimostrato come ci sia una più elevata densità di legame degli spermatozoi utilizzando l'espianto piuttosto che il monostrato cellulare (De Pauw et al., 2002).

È stato scelto di isolare l'istmo e di valutare in questo il processo di adesione. Secondo alcuni Autori qui viene a crearsi il serbatoio spermatico e iniziano modificazioni determinanti per la fecondazione quali capacitazione e iperattivazione (Apichela et al., 2009). Altri Autori indicano il legame degli spermatozoi all'epitelio istmico come fondamentale per il mantenimento della motilità e definiscono l'adesione a livello ampollare come passaggio grazie al quale la capacitazione viene intensificata (Abe et Hoshi, 1997). Abe et Hoshi (1997) riportano anche che le secrezioni da parte delle cellule oviduttali variano per tipo e quantità nei differenti tratti oltreché nei diversi periodi estrali (Fig.4.2). Considerando che a livello di istmo il seme adeso non è ancora andato incontro ad iperattivazione (Gualtieri e Talevi, 2000) si capisce che analizzare l'adesione del seme a questo livello permette di valutare più realisticamente le capacità fecondanti del seme. A livello ampollare rispetto al tratto istmico si rileva la maggior parte di spermatozoi "free-swimming" evidenziando che la motilità dell'iperattivazione possa essere un fattore importante per la mobilitazione degli spermatozoi dal tratto istmico verso il tratto ampollare (Mortimer, 1997). Il seme durante l'AI viene depositato a livello di corpo uterino e andrà poi a livello oviduttale dove avvengono i vari eventi necessari per il successo riproduttivo.

Figura 4.2. Percentuale di cellule secretorie e ciliate nei diversi tratti oviduttali e nei diversi periodi estrali nella bovina.



Fimbriae (F), ampolla (A), istmo (I), giunzione utero-tubarica (UTJ). (Abe et Hoshi, 1997)

Se il seme usato in questa tecnica risultasse avere un alto numero di spermatozoi già iperattivati questi arriverebbero in sede di fecondazione presumibilmente ipovitali, per aver consumato riserve energetiche, e inoltre non andrebbero incontro a tutte quelle modifiche derivate dal processo di adesione e importanti per il processo di fecondazione. Risulta quindi interessante correlare l'ercr con parametri come l'iperattivazione.

Per quanto riguarda il nostro studio il campionamento degli ovidotti non ha tenuto conto della fase del ciclo estrale in cui si trovava la bovina ma ci si è limitati a escludere gli ovidotti provenienti da bovine con evidenti patologie uterine e oviduttali. La letteratura riporta come gli ormoni steroidei ovarici siano ben conosciuti come fattori di regolazione oviduttale. Estrogeni e progesterone sono stati dimostrati regolare processi come l'adesione e il rilascio spermatico a livello oviduttale, la capacitazione e l'iperattivazione (Cerny et al., 2015).

A differenza di altri studi (Apichela et al., 2009) in cui per spermatozoi e ovidotti venivano usati medium diversi noi abbiamo cercato di standardizzare il test utilizzando

solo un medium per entrambi. Durante l'elaborazione del protocollo per il nostro test l'utilizzo di PBS o di h-TALP non ha interferito sui risultati. Per quanto riguarda l'h-TALP già gli studi di De Pauw et al. (2002) avevano avvalorato l'uso di h-TALP rispetto ad altri medium (come IVF-TALP e TCM-199) perché permette di ottenere una maggior conservazione della vitalità spermatica nel tempo. L'uso del PBS sia per il seme che per l'ovidutto è riportato in diversi studi non dare particolare variazioni nei risultati rispetto al TALP (Farrell et al., (1996); Lefebvre et Suarez (1996)). In base alla bibliografia e ai nostri test si è deciso quindi di ricorrere al solo uso del PBS in quanto più semplice da preparare, più facilmente conservabile e più economico.

Studi di Petrunkina (2001) e Apichela (2009) hanno dimostrato che minore è la superficie dell'espianto oviduttale prelevata ($<10000 \mu\text{m}^2$), migliore è la capacità di visualizzazione degli spermatozoi adesi all'epitelio e minore è il rischio di incorrere in errori di valutazione. In questo lavoro si è scelto di prelevare circa $0,1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ ($0,1 \text{ mm}^2$) di mucosa ricorrendo all'uso dello stereomicroscopio. Nella nostra idea di sviluppo di un test facilmente applicabile in campo ed economico questo resta un parametro importante ma non di precisione. L'uso dello stereomicroscopio non è quindi da ritenersi fondamentale.

Figura 4.3. Stereomicroscopio



Fondamentale per standardizzare le osservazioni effettuate al microscopio ottico è invece definire la misura dell'espianto analizzato o meglio determinare un'unità di superficie a cui correlare i dati di adesione. In questo studio è stata scelta come misura il campo microscopico, rispettando l'obiettivo del nostro lavoro cioè creare un test di adesione applicabile in campo e in modo semplice prescindendo dall'uso di strumentazioni capaci di misurare precisamente l'espianto in sede di analisi. La letteratura per quanto riguarda la conta degli spermatozoi adesi riporta invece la necessità di definire l'area dell'espianto (Apichela et al., 2009) e su questa calcolarne l'adesione e di eseguire una colorazione in fluorescenza intravitale (De Pauw et al., 2002).

Nello studio di De Pauw et al. (2002) è risultato che 30 minuti di incubazione della coltura sono sufficienti come tempi per valutare l'adesione. Nel nostro studio si è visto confermato che tempi di 30 e 20 minuti danno risultati sovrapponibili in termini di adesione.

Ecco quindi che per lo svolgimento della seconda fase dello studio si è ricorsi all'uso del PBS come medium e 20 minuti come tempo d'incubazione.

Nella seconda fase di studio si è utilizzato il protocollo sviluppato in fase 1 per testare seme di tori di fertilità nota così da investigare la capacità predittiva del test sulla fertilità.

I parametri CASA del nostro studio non si discostano da quelli riportati dalla letteratura (vedi Kathiravan et al, 2001; Farrell et al., 1998) relativi alla specie bovina.

Il CASA è apparso essere un buono strumento per confrontare la qualità del seme fresco e congelato (Defoin et al., 2008) ma ancora poco chiara risulta la sua reale utilità nel predire le capacità di fecondazione in campo (Kathiravan et al., 2011; Puglisi et al., 2012). Anche nel nostro studio è stata riscontrata una mancanza di variazione tra i dati CASA in dipendenza della fertilità data dal CR. Ipotesi che è stata fatta per giustificare quest'ultimo aspetto è l'incapacità del CASA di valutare l'iperattivazione (HA) con i parametri standard ricavati dallo strumento. Cercando di includere questo fattore, discriminante per la fertilità del seme, come parametro deducibile dai dati del CASA si sono sviluppate formule e si sono stimati valori in grado di predire l'HA (Mortimer et al., 2015; Mortimer, 1997). Ad oggi la letteratura riporta come comprovato che l'iperattivazione sia distinguibile attraverso un aumento dei parametri VCL e ALH con

un corrispondente calo del LIN. Vi è inoltre un valore derivato dai parametri CASA e definito DANCE ($=VCL \times ALH \text{ mean}$) per la determinazione dell'iperattivazione (Mortimer, 1997; Holt et al., 2007).

Analizzando i dati nel nostro lavoro e specificatamente quelli legati al parametro derivato DANCE è possibile ipotizzare che ci sia un grado di iperattivazione più elevata nei soggetti con scarsa fertilità che giustificerebbe l'assenza di variazioni significative tra dati CASA in dipendenza dell'indice ercr.

Il CASA infatti nel determinare il numero degli spermatozoi e nel valutarne la motilità, con i parametri standard, non tiene conto della presenza di spermatozoi iperattivati e in quando tali infertili.

Il test d'adesione invece in quanto test funzionale permette, escludendo dalla valutazione gli spermatozoi iperattivati in quanto incapaci di aderire all'istmo, di stimare più verosimilmente l'effettiva fertilità del seme testato. Il test di adesione, elaborato ed applicato nel nostro studio, ha determinato per queste stesse classi una differenza significativa dimostrando una maggior coerenza di valori tra i soggetti della stessa classe CR e una maggior variabilità tra le classi.

Ad avvalorare l'uso di questo test anche lo studio di Puglisi et al. (2012) in cui si afferma che l'integrità di membrana è risultata essere il parametro più strettamente correlato con la fertilità rispetto alle convenzionali analisi fatte sul seme. Vantaggio di questo test è anche che l'adesione già di per sé discrimina gli spermatozoi iperattivati ma anche quelli con acrosoma non integro (questi infatti non si legano all'ovidutto) risultando esso stesso un criterio di selezione degli spermatozoi con buona capacità fecondante (Talevi et Gualtieri, 2001; Apichela et Stelletta, 2012). Gli spermatozoi che si legano agli espanti oviduttali sono caratterizzati da uno stato non capacitato, acrosoma intatto, morfologia superiore e una normale struttura della cromatina. E' stato inoltre dimostrato che la proporzione di spermatozoi non capacitati presenti nel seme congelato è positivamente correlato con la fertilità. Gli spermatozoi non capacitati avendo una maggior sopravvivenza sono avvantaggiati durante il loro transito verso il sito di fecondazione a livello oviduttale. Quindi ad una più alta percentuale di spermatozoi non capacitati corrisponde un più alto numero di spermatozoi adesi e più alta sarà la capacità fecondante dell'eiaculato (De Pauw et al., 2002).

Per quanto riguarda la terza fase di studio, il test è stato applicato su tori Burlini di cui non si aveva alcun dato circa la fertilità. Il seme utilizzato, selezionato in modo casuale, è stato raccolto e congelato seguendo rigidamente i protocolli di trattamento del seme usati per le dosi utilizzate nelle altre fasi di studio. Dai risultati del test però si vede come tutti e gli otto tori abbiano una media di adesione simile tra loro e che nell'applicare il test per le tre dosi di seme per ogni toro ci sia notevole ripetitività. Paragonando questi dati a quelli relativi ai tori di razza Frisona è evidente che nessuno raggiunge valori di spermatozoi adesi simili a quelli della classe di fertilità più alta e invece molti hanno valori di spermatozoi adesi simili a quelli della classe di fertilità inferiore.

Ad oggi il motivo di questo diverso comportamento del seme di razza Burlina può essere solo ipotizzato e dovrebbe essere correlato con dati di campo per la valutazione della fertilità effettiva dei tori utilizzati nello studio. Tra le ipotesi che si possono fare in base ai dati rilevati consideriamo:

- una diversa risposta razza specifica al test di adesione degli spermatozoi ad espianti di cellule oviduttali;
- una ridotta fertilità di razza;
- una minore resistenza del seme alla manipolazione / preservazione

Il protocollo sviluppato per l'esecuzione del test ha dimostrato la sua validità e ripetibilità, anche in questa fase. I vantaggi del protocollo sviluppato sono la maggior semplicità di esecuzione, il minor costo della strumentazione e materiali di consumo (non richiedendo l'uso né di microscopio a fluorescenza e di coloranti) rispetto ad altri protocolli di test d'adesione.

5. CONCLUSIONI

Il nostro studio come altri (Petrunkina, 2001) ha confermato che il numero di spermatozoi legati ad un espunto oviduttale è un parametro sensibile e riproducibile. Benché sia ormai affermata la relazione tra fertilità e dati CASA (Farrell et al., 1997), è necessario associare altri strumenti per aumentare la previsione di successo del seme. Il test di adesione nella sua semplicità concettuale e di attuazione è risultato essere strettamente legato alla fertilità di campo, mostrando dati più significativi rispetto ad alcuni parametri CASA e altamente ripetibili. Sebbene molti altri studi debbano essere svolti per appurare il legame tra questo test e la fertilità del seme appare ad oggi che l'iperattivazione sia la chiave di lettura per il confronto tra metodiche. Appare comunque chiara la possibilità di far rientrare il test di adesione spermatica alle cellule oviduttali nei protocolli di Breeding Soundness Examination (BSE).

6. BIBLIOGRAFIA

1. **Abe, H.** 1996. The mammalian oviductal epithelium: regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histology and Histopathology* 11(3): 743-68.
2. **Abe, H., Hoshi H.** 1997. Bovine oviductal epithelial cells: their cell culture and applications in studies for reproductive biology. *Cytotechnology* 23(1-3): 171-183.
3. **Abe, H., Sendai Y., Satoh T., Hoshi H.** 1995. Bovine oviduct-specific glycoprotein: A potent factor for maintenance of viability and motility of bovine spermatozoa in vitro. *Molecular reproduction and development* 42(2): 226-232.
4. **Abou-haila, A., Tulsiani D.R.** 2009. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 485(1): 72-81.
5. **Amann, R.P., Waberski D.** 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology* 81(1): 5-17.
6. **Apichela, S., Jiménez-Díaz M., Roldan-Olarte M., Valz-Gianinet J., Miceli D.** 2009. In vivo and in vitro sperm interaction with oviductal epithelial cells of llama. *Reproduction in domestic animals* 44(6): 943-951.
7. **Apichela, S.A., Stelletta, C.** 2012. Prove in vitro di adesione degli spermatozoi e il loro valore per stimare la fertilità negli animali da reddito. *Large Animal Review* 18: 7-11
8. **Ardon, F., Markello R. D., Hu L., Deutsch Z.I., Tung C. K., Wu M., Suarez S. S.** 2016. Dynamics of Bovine Sperm Interaction with Epithelium Differ Between Oviductal Isthmus and Ampulla. *Biology of reproduction*
9. **Aviles, M., Gutierrez-Adan A., Coy P.** 2010. Oviductal secretions: will they be key factors for the future ARTs? *Molecular human reproduction* 16(12): 896-906.
10. **Betteridge, K. J.** 2006. Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. *Theriogenology* 65(5): 905-913.
11. **Boilard, M., Bailey J., Collin S., Dufour M., Sirard M. A.** 2002. Effect of bovine oviduct epithelial cell apical plasma membranes on sperm function assessed by a novel flow cytometric approach. *Biology of reproduction* 67(4): 1125-1132.
12. **Boland, M., Lonergan P., O'callaghan D.** 2001. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 55(6): 1323-1340.
13. **Boryshpolets, S., Kowalski R., Dietrich G., Dzyuba B. e Ciereszko A.** 2013. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology* 80(7): 758-765.
14. **Bosch, P., Wright R.** 2005. The oviductal sperm reservoir in domestic mammals. *Archivos de Medicina Veterinaria* 37(2): 95.

15. **Braundmeier, A. G., Demers J. M., Shanks R. D., Saacke R. G., Miller D. J.** 2002. Examination of the binding ability of bovine spermatozoa to the zona pellucida as an indicator of fertility. *Journal of andrology* 23(5): 645-651.
16. **Cerny, K., E. Garrett E., A. Walton A., Anderson L., Bridges P.** 2015. A transcriptomal analysis of bovine oviductal epithelial cells collected during the follicular phase versus the luteal phase of the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(1): 1.
17. **Chaubal, S., Molina J., Ohlrichs C., Ferre L., Faber D., Bols P., Riesen J., Tian X., Yang X.** 2006. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* 65(8): 1631-1648.
18. **Coy, P., Garcia-Vazquez F. A., Visconti P. E., Aviles M.** 2012. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction* 144(6): 649-660.
19. **De Pauw, I. M., Van Soom A., Laevens H., Verberckmoes S., de Kruif A.** 2002. Sperm binding to epithelial oviduct explants in bulls with different nonreturn rates investigated with a new in vitro model. *Biology of reproduction* 67(4): 1073-1079.
20. **Defoin, L., Granados A., Donnay I.** 2008. Analysing motility parameters on fresh bull semen could help to predict resistance to freezing: A preliminary study. *Reproduction in domestic animals* 43(5): 606-611.
21. **Druart, X.** 2012. Sperm interaction with the female reproductive tract. *Reproduction in domestic animals* 47(s4): 348-352.
22. **Faber, D., Molina J., Ohlrichs C., Vander Zwaag D., Ferre L.** 2003. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 59(1): 125-138.
23. **Farrell, P. B., Foote R. H., Mcardle M.M., Trouern-Trend V.L. Tardif A.L.** 1996. Media and Dilution Procedures Tested to Minimize Handling Effects on Human, Rabbit, and Bull Sperm for Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *Journal of andrology* 17(3): 293-300.
24. **Farrell, P., Presicce G., Brockett C., Foote R.** 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* 49(4): 871-879.
25. **Fréour, T., Jean M., Mirallié S., Dubourdiou S. Barrière P.** 2010. Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 149(2): 186-189.
26. **Galantino-Homer, H. L., Florman H.M., Storey B.T., Dobrinski I., Kopf G.S.** 2004. Bovine sperm capacitation: Assessment of phosphodiesterase activity and intracellular alkalinization on capacitation-associated protein tyrosine phosphorylation. *Molecular reproduction and development* 67(4): 487-500.
27. **Galli, A., Signori T., Balduzzi D.** 1998. Valutazione della funzionalità spermatica tramite citofluorimetria a flusso e microscopia a fluorescenza. *Atti della società italiana di buiatria* XXX.

28. **Galli, C., Duchi R., Crotti G., Turini P., Ponderato N., Colleoni S., Lagutina I., Lazzari G.** 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 59(2): 599-616.
29. **Garner, D., Seidel G.** 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69(7): 886-895.
30. **Gaviraghi, A., Deriu F., Soggiu A., Galli A., Bonacina C., Bonizzi L., P. Roncada P.** 2010. Proteomics to investigate fertility in bulls. *Veterinary research communications* 34(1): 33-36.
31. **Gerena, R., Killian G.** 1990. Electrophoretic characterization of proteins in oviduct fluid of cows during the estrous cycle. *Journal of Experimental Zoology* 256(1): 113-120.
32. **Ghersevich, S., Massa E., Zumoffen C.** 2015. Oviductal secretion and gamete interaction. *Reproduction* 149(1): R1-R14.
33. **Gillan, L., Evans G., Maxwell W.** 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63(2): 445-457.
34. **Goodson, S. G., Zhang Z., Tsuruta J. K., Wang W., O'Brien D. A.** 2011. Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of reproduction* 84(6): 1207-1215.
35. **Grippio, A. A., Anderson S. H., Chapman D.A., Henault M.A., Killian G.J.** 1994. Cholesterol, phospholipid and phospholipase activity of ampullary and isthmic fluid from the bovine oviduct. *Journal of reproduction and fertility* 102(1): 87-93.
36. **Gwathmey, T. M., Ignatz G.G., Mueller J.L., Manjunath P., Suarez S.** 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of reproduction* 75(4): 501-507.
37. **Hasler, J. F.** 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology* 81(1): 152-169.
38. **Hazeleger, N. L., Hill D. J., Stubbing R. B., Walton J. S.** 1995. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. *Theriogenology* 43(2): 509-522.
39. **Holt, W. V., J. O'Brien and T. Abaigar.** 2007. Applications and interpretation of computer-assisted sperm analyses and sperm sorting methods in assisted breeding and comparative research. *Reproduction, Fertility and Development* 19(6): 709-718.
40. **Holt, W. V., Van Look K.J.** 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction* 127(5): 527-535.
41. **Juyena, N. S., Stelletta C.** 2012. Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Journal of andrology* 33(4): 536-551.
42. **Kathiravan, P., Kalatharan J., Karthikeya G., Rengarajan K., Kadirvel G.** 2011. Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System—A Review. *Reproduction in Domestic Animals* 46(1): 165-172.

43. **Lefebvre, R., Chenoweth P. J., Drost M., LeClear C. T., MacCubbin M., Dutton J. T., Suarez S. S.** 1995. Characterization of the oviductal sperm reservoir in cattle. *Biology of reproduction* 53(5): 1066-1074.
44. **Lefebvre, R., Suarez S. S.** 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of reproduction* 54(3): 575-582.
45. **Liu, M.** 2016. Capacitation-Associated Glycocomponents of Mammalian Sperm. *Reproductive sciences* 23(5): 572-594.
46. **Lu, K. H., Gordon I., Chen H. B., Gallagher M., McGover H.** 1988. Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. *The Veterinary record* 122(22): 539-540.
47. **Mapletoft, R.** 1985. Embryo transfer in the cow: General procedures. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* 4 (4), 843-858.
48. **Massanyi, P., Chrenek P., Lukac N., Makarevich A., Ostro A., Zivcak J., Bulla J.** 2008. Comparison of different evaluation chambers for analysis of rabbit spermatozoa motility parameters using CASA system. *Slovak J Anim Sci* 4160-66.
49. **Mondéjar, I., Acuna O., Izquierdo-Rico M., Coy P., Avilés M.** 2012. The oviduct: functional genomic and proteomic approach. *Reproduction in domestic animals* 47(s3): 22-29.
50. **Morrell, J. M.** 1991. Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. *The Veterinary record* 129(17): 375-378.
51. **Mortimer, S. T.** 1997. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human reproduction update* 3(5): 403-439.
52. **Mortimer, S. T., van der Horst G., Mortimer D.** 2015. The future of computer-aided sperm analysis. *Asian Journal of Andrology* 17(4): 545-553.
53. **Petrunkina, A. M., Gehlhaar R., Drommer W., Waberski D., Topfer-Petersen E.** 2001. Selective sperm binding to pig oviductal epithelium in vitro. *Reproduction* 121(6): 889-896.
54. **Puglisi, R., Pozzi A., Foglio L., Spanò M., Eleuteri P., Grollino M.G., Bongioni G., Galli A.** 2012. The usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. *Animal Reproduction Science* 132(1): 17-28.
55. **Pursley, J., Wiltbank M., Stevenson J., Ottobre J., Garverick H., Anderson L.** 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *Journal of dairy science* 80(2): 295-300.
56. **Rodriguez-Martinez, H.** 2012. Assisted Reproductive Techniques for Cattle Breeding in Developing Countries: A Critical Appraisal of Their Value and Limitations. *Reproduction in domestic animals* (1990) 47(SI): 21-26.
57. **Scott, M. A.** 2000. A glimpse at sperm function in vivo: sperm transport and epithelial interaction in the female reproductive tract. *Animal Reproduction Science* 60337-348.

58. **Smith, C., Ruane J.** 1987. Use of sib testing as a supplement to progeny testing to improve the genetic merit of commercial semen in dairy cattle. *Canadian Journal of Animal Science* 67(4): 985-990.
59. **Suarez, S. S.** 2008. Control of hyperactivation in sperm. *Human reproduction update* 14(6): 647-657.
60. **Suarez, S. S., Pacey A.A.** 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human reproduction update* 12(1): 23-37.
61. **Talevi, R., Gualtieri R.** 2001. Sulfated glycoconjugates are powerful modulators of bovine sperm adhesion and release from the oviductal epithelium in vitro. *Biology of reproduction* 64(2): 491-498.
62. **Van Wagtenonk-de Leeuw, A.** 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65(5): 914-925.
63. **Van Wagtenonk-de Leeuw, A., Mullaart E., De Roos A., Merton J., Den Daas J., Kemp B., De Ruigh L.** 2000. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology* 53(2): 575-597.
64. **Varner, D. D.** 2015. Odyssey of the spermatozoon. *Asian Journal of Andrology* 17(4): 522-528.
65. **Velazquez, M. A.** 2008. Assisted reproductive technologies in cattle: applications in livestock production, biomedical research and conservation biology. *Annual Review of Biomedical Sciences* 1036-62.
66. **Vincent, P., Underwood S. L., Dolbec C., Bouchard N., Kroetsch T., Blondin P.** 2012. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. *Anim Reprod* 9(3): 153-165.
67. **Wassarman, P. M.** 1999. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 96(2): 175-183.
68. **Willett, E. L., Black W.G., Casida L.E., Stone W. H., Buckner P. J.** 1951. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science* 113(2931): 247.
69. **Wright, J. M.** 1981. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology* 15(1): 43-56.
70. **Yanagimachi, R.** 1970. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. *Journal of reproduction and fertility* 23(1): 193-196.
71. **Yanagimachi R.** 1994. *Mammalian Fertilization*, 2nd edn. New York, NY: Raven Press.

Ringraziamenti

Speravo di arrivare a scrivere i ringraziamenti con meno fretta e dopo un cympari canar e invece niente!

Inizio con il ringraziare il Prof. Calogero Stelletta per la passione dimostrata e trasmessa durante questa ricerca, per la pazienza e la disponibilità e per aver cercato di tranquillizzarmi!

Grazie a Giancarlo e Maria Rosa, i miei genitori, per avermi sostenuto nelle scelte condividendo con me la soddisfazione di questo traguardo e le pene che ci son volute per arrivarci (mi ricordo come vi siete commossi quando ho finalmente passato il test!). Grazie alle mie sorelle, Elisa e Stefania, lunatiche betoneghe per esser cresciute con me (e io nei vostri vestiti!), per i nostri infiniti litigi, per le ciacoe fatte a tutte le ore. Nonostante tutti gli sponi ho una bella famigliola! Ve vojo ben! Grazie alle mie nonne Lina e Cornelia, a nonna Lina per avermi insegnato che il sorriso è gratuito e appaga molto più di qualsiasi altra cosa sia nel donarlo che nel riceverlo (ricordiamoci:” finché il prete cena ...cosa fa la serva?!?!?”). A nonna Cornelia e alle sue telefonate negli orari peggiori perché se non ci fossero mancherebbero! Per i pochi minuti di ciacoe che arricchiscono la giornata e per esser sempre pronta a cucinare per noi! Grazie ai miei nonni, Erminio e Fausto, so che starete facendo festa anche voi!

E ora inizia la sagra! Grazie al Pevito nanetta graziosa ma anche un po' iena! Per la tua presenza discreta e la tua risposta sempre pronta, per la tua sincerità e limpidezza che talvolta ha portato a tirarci i capelli! Mi mancano le nostre finte corse sull'argine, passate a parlare o adocchiar gente da stalkerare! Mary culino grazie per il tuo modo di estrapolare pensieri e paranoie...quando xe che te parli ti però?!?(e non fare la faccia da strega!). Grazie perché anche se ci vediamo poco il tempo passato assieme è sempre ricco... di birette, volgarità e quant' altro!! Grazie a Gaspa per avermi approcciata in quel di Agripolis senza quel tuo passo non avrei conosciuto la bionda baffuta boara che sei! Grazie per esser presente nonostante i tuoi mille spostamenti e la vita da mujer! a quando un giro in parcheggio a ballar!? Grazie a Ilaria che in realtà ho scoperto bene solo ultimamente. Grazie per avermi fatto compagnia in aula studio, per il tuo impegno nel farmi mangiare preoccupandoti per la mia dieta pre-spriss! Un brindisi per la tua specialità!!! Grazie a Pippo per l'amicizia che ci lega dalle sbronze liceali, per la tua

sensibilità e per aver iniziato a reggere meglio l'alcool...finalmente via san Francesco è "pulita"! Grazie a Diba per aver ascoltato più volte le mie fisime, per avermi lasciato usare il bagno di casa tua per necessità impellenti e aver sopportato invasioni repentine dei tuoi spazi ad ogni ora, per esser un compagno di bevute quasi quotidiano (anche se ultimamente sei un po' schiappa) e un cuoco eccezionale anche per gli sglutinelli! Grazie a Lory compagna di lavoro e compagna di feste ma quasi mai di ritorni a casa in bici! Per la tua mente paranoica ma premurosa! Grazie a Gio per la sua proverbiale ospitalità per essere un panzone rompicojoni e esser sempre pronto o quasi a farsi un caffè al Fly! Grazie a Gas per avermi sopportato in questo periodo tra domande su impaginazioni, sto sommario terribile, esame di stato ecc ti avrò moderatamente stressato! Ora devo finire o non stampo più la tesi per cui devo velocizzarmi sperando di non dimenticare nessuno anche se ovviamente succederà... Ringrazio Maru, Sofy, Eleonora, Stefy e Anna, Beber schifo, Red e Toby, Davide per essersi offerto tra l'altro di aiutarmi ad impaginare (dovevo accettare!!), Marco pizze e tutti i ragazzi che ho conosciuto lavorando (Nicola pizze , Michele pizze), il Prof. Cecchi , Juri, Pavo, Giorgia (spero el grintòn si sia conservato fino a questo giorno!!), Umbe per la sua misoginia e la Mitea tutta. Ringrazio il Dottor. Marcello Lora per avermi fatto conoscere la buiatria da vicino (e per essere il mio James Herriot!), stare in malga da lei e girare con il suo furgone sono state forse le esperienze più belle della mia vita e che spero potranno rivivere nella mia quotidianità! Ringrazio infine gli animali,ad oggi ancor pochi, che hanno reso la mia vita fin qui decisamente migliore: Larry cagnasso manchi a tutti qui a casa (non dico altro o piango), Pietro l'unico ospite sempre coccolato e sempre benvenuto! Un pensiero e un minutino di silenzio a Jhonny e Iccio due animali che diciamocelo...ho sbadatamente ucciso e che mi han fatto capire i limiti della mia vocazione!

E per ultimissimo ringrazio Alessandro, Mimmo, Tenerè, Gennarino ecc. che altro non sono che la stessa persona. I ringraziamenti a te li ho scritti giorni fa! E dicevano questo: "Li scrivo oggi che poi magari litighiamo.Ti ringrazio per essere il mio amore nonostante tanti momenti difficilini, per farmi rendere conto di quanto sia lamentony ma anche popetty , per essermi stato vicino e avermi aiutato nel partorire questa tesi e per credere in me...spero domani di esser più tranquilla."Son passati cinque giorni e lo penso ancora!
VITTORIA!!!

Grazie a tuttiiiii!!!