A Talete perché fu

“il primo scopritore della geometria,

l’osservatore sicurissimo della natura,

lo studioso dottissimo delle stelle”

APULEIO

PREMESSA **7**

1 INTRODUZIONE **9**

1.1 Storia della valutazione andrologica nel maschio 9

1.2 Applicazione dell'esame andrologico 12

1.2.1 Mancanza di libido 12

1.2.2 Incapacità di compiere una monta efficace 14

1.2.3 Incapacità di eiaculare 14

1.2.4 Mancanza di fertilizzazione 14

1.2.5 Anomalie del seme 15

1.3 Aspetti comparativi della valutazione andrologica nell'animale da reddito 15

1.3.1 Bovino 15

1.3.2 Ariete 16

1.3.3 Becco 17

1.3.4 Cavallo 18

1.3.5 Bisonte 19

1.3.6 Cammello 19

1.4 Parametri tradizionalmente proposti 19

1.4.1 Esame dello stato fisico 19

1.4.2 Valutazione dell'apparato riproduttore 24

1.4.3 Valutazione del seme 28

1.4.4 Valutazione della libido 32

1.4.4.1 Valutazione della libido nel becco 36

1.5 Limiti dell'approccio tradizionale 37

1.6 Parametri innovativi per la valutazione andrologica 38

1.6.1 Esame ecografico 38

1.6.1.1 Utilità clinica 39

1.6.1.2 Aspetto ecografico 41

1.6.1.3 Valutazione della "pixel-intensity" nell'ecografia testicolare 44

1.6.2 Esame ematobiochimico e profilo ormonale tiroideo 45
1.6.3 Valori ematici di testosterone 46
1.7 Trasferibilità del protocollo alla specie caprina tipicamente stagionale 46
1.8 Obiettivi 48
2 MATERIALI E METODI 49
2.1 1ª settimana: "pre-esposizione" 50
2.1.1 Selezione degli animali 50
2.1.2 Alimentazione e contatto con il personale 51
2.1.3 Valutazione sanitaria 52
2.1.4 Prelievi di sangue 53
2.2 2ª e 3 ª settimana: "esposizione" 55
2.2.1 Esposizione individuale 55
2.2.1.1 Valutazione del seme 56
2.2.1.2 Osservazione del comportamento durante l'utilizzo della Vagina Artificiale 56
2.2.2 Esposizione al gruppo 56
2.3 4ª settimana: "post - esposizione" 57
2.4 Metodo laboratoristico impiegato per il dosaggio della testosteronemia 58
2.4.1 Limiti del test 59
2.4.2 Prestazioni del test 59
2.5 Metodo laboratoristico utilizzato per la determinazione dell'esame ematobiochimico 60
2.6 Metodo laboratoristico utilizzato per la determinazione delle concentrazioni ematiche di TSH, T3, T4 60
2.7 Preparazione del medium diluitore 62
2.8 Analisi dei dati 62
3 RISULTATI 67

3.1 Esame clinico 67
3.2 Esami strumentali 68
3.3 Qualità del seme 75
3.4 Valutazione della libido 76
4 DISCUSSIONE 85
4.1 Esame clinico e strumentale 85
4.3 Valutazione della qualità seminale 90
4.4 Valutazione della libido 91
5 CONCLUSIONI 93
BIBLIOGRAFIA 95

PREMESSA

La stima del potenziale riproduttivo si rende particolarmente utile:

- In giovani soggetti da adibire alla riproduzione (dopo e/o durante i Performance test);
- In tutti i riproduttori che entrino per la prima volta in un "Centro Riproduttivo";
- In contratti di compravendita;
- Ogni qualvolta si verifichi un calo della fertilità del riproduttore e/o un decadimento delle caratteristiche qualitative del seme.

La letteratura scientifica è carente di lavori in cui vengano standardizzati rigorosamente i parametri per la valutazione andrologica nel becco, in particolare nel periodo immediatamente precedente la stagione riproduttiva.

Anticipare l'esame in questa specie è particolarmente importante: la precocità di diagnosi di scarsa fertilità è fondamentale in termini economici.

In questo studio vengono proposti dei parametri per tale valutazione e un modello sperimentale che la renda praticabile in un periodo precedente all'inizio della stagione riproduttiva.

1 INTRODUZIONE

1.1 Storia della valutazione andrologica nel maschio

La stima del potenziale riproduttivo nel maschio è tradizionalmente affidata al BSE (Breeding Soundness Evaluation), un esame sviluppato inizialmente nella specie bovina, che permette di ottenere una valutazione oggettiva e ripetibile.

Secondo Chenoweth (Chenoweth, 2008) i primi studi sistematici sulla fertilità del toro possono essere fatti risalire ai lavori pionieristici di Williams e Savage, compiuti rispettivamente nel 1909 e 1925, e al programma svedese proposto da Lagerlof nel 1936.

Le ricerche compiute in seguito furono influenzate dallo sviluppo delle tecniche di inseminazione artificiale, dal primo Congresso sulla Riproduzione Animale e l'A.I. (Milano, 1948) e dall'avvio del primo programma di test ambulatoriali sul toro in Colorado nel 1954.

Chenoweth sottolinea anche l'importanza di una pubblicazione di Carol et al. del 1963 che riporta il risultato della valutazione dei parametri riproduttivi di 10.940 tori dimostrando come fosse possibile testarli sul campo e su larga scala.

È del 1974 la fondazione dell'American Society for Theriogenology che ha promosso la diffusione di procedure standardizzate per il *breeding sundness evaluation* (utilizzando l'acronimo BSE), la cui più recente versione è del 1992 (fig 1), ad opera di Chenoweth et al., utilizzata ad oggi dai veterinari di un gran numero di paesi (Chenoweth, 2008).

Alcune linee standard per la valutazione del toro sono state pubblicate separatamente anche dall'Australian Association of Cattle Veterinarians (Anon, 1995) e dalla Western Canadian Association of Bovine Practitioners (Barth, 1993).

Classificazione del potenziale riproduttivo del toro secondo gli standard della Society for Theriogenology, 1992:

- *Soddisfacente:*

il soggetto eguaglia o supera la soglia

  - di circonferenza scrotale: > 32cm;
  - di motilità spermatica: > 30%;
  - di morfologia spermatica: > 70%;

non mostra di avere problemi genetici, infettivi o di altro tipo in grado di compromettere la capacità di accoppiamento o la fertilità.

- *Insoddisfacente:*

  - il soggetto non supera la soglia di uno o più parametri;
  - È improbabile che migliori nel tempo;
  - Mostra di avere problemi genetici, infettivi o di altro tipo in grado di compromettere la capacità di accoppiamento o la fertilità.

- *Da rivedere* (con indicazione della data in cui riesaminarlo):

  - tori che non rientrano nelle categorie di cui sopra;
  - tori che possono beneficiare di un riesame;
  - tori che non superano gli standard ma che hanno la possibilità di migliorare(in accrescimento) (Chenoweth et al., 1993).

Fig. 1. The Bull BSE form copyright from the Society for Theriogenology

© Copyright 2005 Society For Theriogenology
FOR USE BY MEMBERS ONLY

Bull Breeding Soundness Evaluation

Guidelines Established by Society for Theriogenology
P.O. Box 3007 • Montgomery, AL 36109
Phone 334/395-4666 • Fax 334/270-3399 • www.therio.org

Sample - for teaching only.

OWNER	CASE NO.	DATE
ADDRESS	BULL NAME	BREED
ZIP	I.D. NO.	Brand ❑ Tattoo ❑ Ear Tag ❑
TELEPHONE ( )	BIRTH DATE	AGE (MO.)
HISTORY: Previous BSE — DATE	CASE NO.	CLASSIFICATION

PHYSICAL EXAMINATION	
Body Condition Score _____ Thin ❑ Moderate ❑ Good ❑ Obese ❑ Beef 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 Pelvic Ht. _____ Width _____ Area _____ Dairy 1, 2, 3, 4, 5	
Feet/Legs	❑
Eyes	❑
Vesicular Glands	❑
Ampullae/Prostate	❑
Inguinal Rings	❑
Penis/Prepuce	❑
Testes/Spermatic Cord	❑
Epididymides	❑
Scrotum (Shape)	❑
Other	
SCROTAL CIRCUMFERENCE (CM) _____	
This bull has been examined for physical soundness and quality of semen only. Unless otherwise noted, no diagnostic tests were undertaken for libido, mating ability or infectious disease status of this bull.	
Remarks and Interpretation (diagnosis, prognosis, recommendations)	

SEMEN EXAMINATION		
Collection Method: EE ❑ AV ❑ Massage ❑ Response: Erection ❑ Protrusion ❑ Ejaculation ❑		
Semen Characteristics	Ejaculate 1	Ejaculate 2
Motility — Gross (or) Individual (%)		
% Normal Cells		
% Primary Abnormalities		
% Secondary Abnormalities		
WBC, RBC, Other		

CLASSIFICATION

Interpretation of data resulting from this examination would indicate that on this date, this bull is a:

- ❑ Satisfactory potential breeder
- ❑ Unsatisfactory potential breeder
- ❑ Classification Deferred

Re-examination recommended on _____ DATE

Signed: _____ MEMBER—SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY

Clinic:

1.2 Applicazione dell'esame andrologico

L'obiettivo fondamentale è l'individuazione di condizioni che possano compromettere la funzione di riproduttore di un maschio.

Le anomalie riproduttive che causano infertilità assoluta o relativa sono state classicamente divise in due classi principali, a seconda che le condizioni causino impossibilità a una normale monta (impotentia coeundi) o al concepimento dopo una normale monta (impotentia generandi) (Noaks et al., 2001).

1.2.1 Mancanza di libido

L'incapacità o la non-volontà di copulare sono segni relativamente frequenti di disordini al sistema riproduttivo maschile. Ad ogni modo la sindrome da mancanza di libido è una delle più difficili da comprendere, perché non è causata solo da patologie genitali, ma anche da altre situazioni intercorrenti, di tipo patologico ma anche manageriali, di età, maturità o stagione. Inoltre molte malattie che normalmente presentano altri segni clinici possono, se trascurate, manifestarsi in forma di animale sessualmente disinteressato. Infine le difficoltà di raggiungere una diagnosi in caso di scarsa libido sono ulteriormente accresciute dal rifiuto di alcuni maschi normali di accoppiarsi in presenza di uomini (Noaks et al., 2001).

Maturità, età, esperienza, management dell'allevamento

La mancanza di libido può manifestarsi in animali troppo giovani o troppo vecchi, e comunque, poiché l'età in cui si manifesta l'inizio dell'attività riproduttiva è un carattere ereditabile, è indesiderabile utilizzare animali che manifestino per tale parametro un ritardo considerevole.

La posizione all'interno della gerarchia di gruppo può pesantemente influenzare l'animale nelle sue manifestazioni comportamentali.

Inoltre anche la scadente gestione della stazione di monta (pavimenti scivolosi, femmine troppo grandi e personale poco attento) può

rappresentare un'importante causa di mancanza di libido (Noaks et al., 2001).

Disfunzioni dell'apparato locomotore

La maggior parte delle lesioni a carico dell'apparato locomotore influenza negativamente l'abilità e il desiderio di accoppiarsi.

Anche una cattiva conformazione del piede è una causa molto comune, ad esempio unghioni eccessivamente lunghi possono provocare una mancanza di volontà a montare o comunque a mantenere la posizione bipede posteriore per un tempo sufficientemente lungo perché avvenga un accoppiamento efficace (Noaks et al., 2001).

Esistono patologie specifiche caprine che occorre tener presente perché in grado di coinvolgere ossa, articolazioni e muscoli e rendere l'animale restio o incapace di sostenere una monta: l'osteodistrofia, l'osteoporosi, la spondilosi, i difetti di appiombo, la rottura del muscolo gastrocnemio, le artriti, la CAE (Artrite-Encefalite caprina), la tenosinovite suppurativa, gli ascessi al piede, le laminiti (fig. 2). Le artriti, generalmente di origine infettiva, soprattutto nei giovani, sono causate da Micoplasma e Clamidia e rappresentano una delle ragioni più frequenti per cui il becco è eliminato dalle campagne di riproduzione (Linklater, Smith, 1993).

Fig. 2. Laminiti.

Tali patologie possono essere così dolorose da costringere l'animale a camminare sui carpi (tratto da Linklater, Smith, 1993)

Disfunzioni di tipo ormonale:

La libido dipende primariamente dagli ormoni, che permettono l'espressione di un comportamento aggressivo e l'accoppiamento. Per quanto sia chiara la dipendenza del comportamento maschile dagli

androgeni, la relazione tra la concentrazione assoluta di androgeni e la libido è dibattuta (Foote et al., 1976; Wodzika-Tomaszewska et al., 1981): non tutti concordano sull'esistenza di correlazioni positive tra le concentrazioni di testosterone e la libido.

Cause frequenti di anomalie nell'equilibrio ormonale nella specie caprina sono lo pseudoermafroditismo maschile in becchi privi di corna, il freemartinismo con testicoli aspermatogenici e la diminuita secrezione di androgeni di origine testicolare o ipofisaria (Linklater, Smith, 1993).

1.2.2 Incapacità di compiere una monta efficace

L'incapacità di accoppiarsi è una causa relativamente frequente di infertilità negli animali domestici, e può essere conseguenza di impossibilità o anomalie di erezione, oppure di anomalie a carico di pene e prepuzio (fig. 3) (Linklater, Smith, 1993; Noaks et al., 2001).

Fig. 3. Adesioni prepuziali

Tratto da Linklater, Smith, 1993

1.2.3 Incapacità di eiaculare

Il riflesso di eiaculazione può essere impedito (come in caso di lesioni alle vie neuronali tra midollo spinale e glande del pene) oppure può verificarsi ritrosia all'eiaculazione a causa di un dolore localizzato (come in caso di peritoniti localizzate nell'addome caudale che provocano dolore durante la spinta eiaculatoria; algia alla schiena e al pene) (Noaks et al., 2001).

1.2.4 Mancanza di fertilizzazione

La mancata fertilizzazione della femmina rende l'animale infertile, ed è generalmente conseguenza di patologie del testicolo (incluse le anomalie nella spermatogenesi), dell'epididimo e delle ghiandole accessorie (fig. 4). Alcune anomalie possono essere diagnosticate grazie all'esame dei

genitali esterni, ma molte di più tramite la valutazione del seme, che è una componente fondamentale dell'esame clinico (Noaks et al., 2001).

È importante differenziare comunque le patologie riproduttive dalle cause non patologiche. Tra quest'ultime è fondamentale il periodo dell'anno in cui si effettua la valutazione (Noaks et al., 2001).

Fig. 4. Mineralizzazione testicolare

Tratto da Linklater, Smith, 1993

1.2.5 Anomalie del seme

Ogni anomalia riscontrata nei parametri solitamente considerati nella valutazione del seme ha una terminologia specifica (tabella 1.).

Tabella 1. Nomenclatura delle anomalie seminali

Volume	Assente	Aspermia
	Ridotto	Ipospermia
	Aumentato	Iperspermia
Concentrazione	0	Azoospermia
	Ridotta	Oligospermia
	Normale	Normozoospermia
	Aumentata	Polizoospermia
Motilità	Ridotta	Astenozoospermia
Vitalità	Totalità di spermatozoi morti	Necrozoospermia
Morfologia	Abbondanza di spermatozoi anomali	Teratozoospermia

1.3 Aspetti comparativi della valutazione andrologica nell'animale da reddito

1.3.1 Bovino

In questa specie sono state proposte per la prima volta delle norme per la valutazione andrologica tramite la standardizzazione del BSE, e ad oggi il toro è l'animale in cui più è sviluppata la bibliografia di riferimento in merito all'esame della potenzialità riproduttiva (Chenoweth, 2004).

In uno studio del 2002 Mcgowan et al. hanno identificato una serie di misurazioni relative allo stato fisico del toro, correlandole poi tra loro e con la fertilità effettiva. I parametri considerati all'interno dell'esame fisico erano: peso vivo e BCS, consistenza testicolare e circonferenza scrotale, condizioni di prepuzio e ombelico.

Sempre nel 2002 Bertram et al. definiscono un modello sperimentale per la valutazione della libido in monta naturale in grado di fornire una previsione attendibile delle capacità dell'animale. Esso si basa sulla considerazione delle manifestazioni di interesse, del numero di monte e di eiaculati.

L'indagine della "pixel intensity" (vedi oltre) rappresenta uno dei più recenti traguardi nell'applicazione dell'ecografia testicolare alla valutazione dell'apparato riproduttore (Kastelic et al., 2001; Arteaga et al., 2005).

Kastelic e Thundatil nel 2008 propongono la combinazione di tecniche molecolari applicate alla valutazione del seme come ulteriore sviluppo nell'esame delle potenzialità riproduttive.

1.3.2 Ariete

Si effettua l'esame fisico, dell'apparato riproduttore e del seme, e solo sporadicamente si va ad indagare la libido. (tabella 2; figura 5)

Tabella 2. Valutazione andrologica dell'ariete

Insoddisfacente	c.s. < 33cm	Motilità < 30%	Morfologia < 70%	Non indica necessariamente sterilità. Scartare o ritestare
Soddisfacente	c.s. > 33cm	Motilità > 30%	Morfologia > 70%	Indica un potenziale riproduttivo accettabile, non autentica fertilità
Eccellente	c.s. > 35cm	Motilità > 50%	Morfologia > 90%	Indica potenziale riproduttivo molto alto
Da rivedere	È necessario posticipare la valutazione di 30 o 60 giorni.			

Fig. 5. Scheda per la raccolta dati necessaria alla valutazione andrologica dell'ariete

Ram Minimal Score System

Owner:		Date:	Result:	
Address:		Recommendation:		
Ram Identification:		Age :	Breed:	
Parameter	Score		(%)	Comments:
Body Condition Score:	1 to 2	questionable		
	3 to 4	satisfactory		
	5	questionable		
Physical Examination:				
Eyes:	Normal	satisfactory		
	Abnormal	questionable		
	Hereditable Defect	unsatisfactory		
Mouth:	Normal	satisfactory		
	Abnormal	questionable		
	Hereditable Defect	unsatisfactory		
Legs/Feet	Normal	satisfactory		
	Abnormal	questionable		
	Severe Lameness	unsatisfactory		
Prepuce	Normal	satisfactory		
	Mild Pizzle rot	questionable		
	Severe Pizzle rot	unsatisfactory		
	Frostbite	unsatisfactory		
Penis:	Normal	satisfactory		
	Adhesions	unsatisfactory		
	Deviations	unsatisfactory		
Scrotum and its Contents:	Normal	satisfactory		
	Dermatitis	questionable		
	Frostbite	unsatisfactory		
	Mange	unsatisfactory		
	Cryptorchidism	unsatisfactory		
	Hernias	unsatisfactory		
	Epididymitis	unsatisfactory		
	Abscesses	unsatisfactory		
	Granulomas	unsatisfactory		
	Varicocoele	questionable		
	Testicular Atrophy	unsatisfactory		
Scrotal Circumference:				
(8 to 14 mos. of age)	< 30 cm	questionable		
	30 to 36 cm	satisfactory		
	> 36 cm	exceptional		
(> 14 mos. of age)	< 32 cm	questionable		
	32-40 cm	satisfactory		
	> 40 cm	exceptional		
Sperm Motility:	0%	unsatisfactory		
	10 - 30%	questionable		
	30 - 70 %	satisfactory		
	71 - 100 %	exceptional		
Sperm Morphology:	< 30 %	unsatisfactory		
	30 - 50 %	questionable		
	51 - 80 %	satisfactory		
	> 80 %	exceptional		
Seminal White Blood Cells:	< 5 per HPF	satisfactory		
	> 5 per HPF	questionable		
Brucella ovis Titer by ELISA:	negative	satisfactory		
	suspect	questionable		
	positive	unsatisfactory		
Interpretation:				
ANY unsatisfactory rating in one category renders the ram unsatisfactory for breeding soundness. ANY questionable rating in one category renders the ram questionable w.r.t. the BSE and he should be retested in 30 to 60 days.				

William B. Ley, DVM, MS, Diplomate, American College of Theriogenologists
VA-MD Regional College of Veterinary Medicine
Associate Professor, Production Management Medicine

Signature _____

1.3.3 Becco

Anche nella specie caprina si esegue un esame delle condizioni fisiche generali e dell'apparato riproduttore, la valutazione della libido e del seme.

L'utilizzo dell'esame andrologico è visto in maniera spesso contrastante da molti autori e alcuni sostengono che spesso non sia necessario

effettuarlo; l'accertamento del potenziale riproduttivo è però indispensabile negli schemi di sincronizzazione e nella produzione di seme e in ogni caso dovrebbe essere condotto su becchi utilizzati in programmi di riproduzione (INTERVET, 2003; Youngquist, Threlfall, 2007).

Sicuramente la valutazione del potenziale riproduttivo dei maschi è di fondamentale importanza nella costituzione di un gregge, in quanto il rapporto becchi:capre è piuttosto elevato (soprattutto se si ricorre all'AI) e questo fa sì che qualsiasi difetto o anomalia di cui il becco sia portatore possa essere trasmesso a una progenie molto numerosa (Lee Owen, 1977).

In Francia esiste un programma di miglioramento genetico che ha ottenuto importanti risultati nell'arco di un periodo relativamente breve. Tutti i maschi che entrano nei centri di produzione del seme sono selezionati secondo uno schema per il miglioramento della produzione lattearia. L'organismo responsabile della selezione, Caprigene, determina le regole genetiche secondo le quali i giovani maschi possono entrare nel centro A.I.. La loro attitudine riproduttiva è valutata dopo il raggruppamento in un centro di allevamento dai 3 mesi. Il primo passo nella scelta dei riproduttori riguarda le loro caratteristiche fenotipiche: vengono eliminati gli animali che presentano difetti di appiombi, anomalie del tratto genitale o una crescita insoddisfacente tra i 3 e i 7 mesi. In seguito vengono testati in base alla loro capacità di produrre seme in grandi quantità e di buona qualità, e solo infine sono sottoposti a prove di progenie (Leboeuf et al., 1998).

1.3.4 Cavallo

Il tasso di gravidanza nelle popolazioni di cavalli dipende dalla fertilità innata di fattrici e stalloni coinvolti e dalla qualità della gestione degli accoppiamenti. Poiché un singolo stallone si accoppia generalmente con molte femmine, la sua fertilità è un fattore critico del successo complessivo di un programma di riproduzione. Sfortunatamente una valutazione accurata della sua fertilità richiede un gran numero di fattrici

da coprire ed è necessariamente retrospettiva. L'ideale sarebbe invece predirla in anticipo rispetto alla sua carriera riproduttiva. Questo è attualmente ottenuto attraverso uno scrupoloso esame fisico (con speciale attenzione ai genitali esterni, agli arti pelvici e alla conformazione della colonna vertebrale), un'appropriata valutazione della libido (in particolare si valuta il tempo di reazione tra la presentazione della femmina e la prima eiaculazione) e delle capacità di monta e tramite analisi routinarie della qualità del seme (Colenbrander et al., 2003).

La valutazione deve inoltre includere: un'anamnesi dettagliata su performance, carriera riproduttiva e comportamento riproduttivo se disponibile; test per confermare l'assenza di patologie infettive o contagiose; produzione di puledri liberi da difetti genetici.

Queste informazioni dovrebbero permettere all'esaminatore di predire l'impatto dello stallone sull'efficienza riproduttiva del gruppo di fattrici (Hurtgen, 1992).

1.3.5 Bisonte

Le linee guida della Society for Theriogenology del 1992 sono state efficacemente utilizzate anche in questa specie per la definizione di standard minimi per la selezione di maschi riproduttori (Keen et al., 1999).

1.3.6 Cammello

Uno studio del 1988 ha condotto valutazioni cliniche e autoptiche, misurando e pesando i vari segmenti dell'apparato genitale, allo scopo di stabilire linee guida per l'interpretazione dei dati ottenuti tramite l'esame andrologico in questa specie (Djang et al., 1988).

1.4 Parametri tradizionalmente proposti

1.4.1 Valutazione della condizione fisica complessiva

L'anamnesi è una parte importante dell'esame poichè molte delle cause di infertilità non si manifestano prima che sia trascorso un considerevole intervallo di tempo dall'insulto; pertanto un'attenta interrogazione del proprietario, spesso su fatti al tempo considerati trascurabili, può essere necessaria per la loro individuazione (Noaks et al., 2001).

Importante è anche osservare l'ambiente quotidiano dell'animale: come è gestito, le condizioni di stabulazione, pulizia e alimentazione; controllare anche il locale in cui sono previste le monte, il percorso che l'animale dovrà compiere per raggiungerlo, la gestione dell'animale stesso durante la monta (Noaks et al., 2001).

L'anamnesi recente mira a delineare lo stato sanitario attuale, la posizione dell'animale nella gerarchia del gruppo, l'eventuale comparsa e decorso di sintomi di una patologia in atto (Messieri, Moretti, 1963).

Sebbene qualsiasi malattia sistemica possa interferire con le performance riproduttive, tre sono le tipologie di particolare importanza: le patologie dell'apparato locomotore, le condizioni che causano dolore nell'addome caudale e tutto ciò che può comportare piressia prolungata. Condizioni algiche al treno posteriore, se prolungate, non solo limitano direttamente le possibilità di accoppiamento, ma possono anche causare inabilità alla spermatogenesi mediata dai corticosteroidi; un risultato simile avviene anche in caso di piressia prolungata tramite aumento della temperatura nel testicolo (Noaks et al., 2001).

È fondamentale valutare se il soggetto in esame appartiene ad alcune determinate razze perchè alcune patologie hanno in esse maggior incidenza; ad esempio becchi di razza Angora sono maggiormente predisposti a sviluppare postiti e criptorchidismo, mentre il granuloma spermatico è più frequente nel becco acorne (Linkslater, Smith, 1993).

Poiché i testicoli sono presenti nello scroto già dalla nascita o poco dopo, ma tutti i becchi prepuberi hanno adesione tra prepuzio e pene, è importante tenere in considerazione l'età del soggetto. Il processo uretrale si separa a 3,5 mesi e il glande è completamente libero dalla mucosa prepuziale a 4,5 mesi. L'inizio della pubertà (spermatogenesi, comparsa di spermatozoi nell'eiaculato e capacità di penetrazione) è razza-dipendente: nei Maltesi si pone a 2-3 mesi, nei Nubiani, Moxoto e Boeri a 4-5 e nei Becchi di Damasco a 12-48 mesi. La maggior parte delle razze allevate nel nostro emisfero manifesta presenza di spermatozoi

nell'eiaculato già a 4-5 mesi, ma a quest'età la qualità spermatica è comunque scarsa (Youngquist, Threlfall, 2007).

Vi sono valutazioni riguardabti lo stato fisico che non possono prescindere da considerazioni riguardanti l'età; alcuni difetti tendono infatti a peggiorare con l'invecchiamento: debole conformazione della colonna vertebrale e cattiva conformazione di spalla, arti e piedi (Lee Owen, 1977).

Le condizioni invalidanti la capacità riproduttiva a carico dello scheletro sono le lesioni alla schiena e agli arti e le patologie del piede (o una sua cattiva conformazione)

Controllare la spalla: se l'animale alza la testa mentre l'arto anteriore è in avanti, trascina gli anteriori, zoppica su terreno morbido o duro o abduce l'arto nell'atto di portarlo avanti.

Controllare anca o ginocchio: se l'animale ha problemi a sollevarsi sui posteriori o a superare un ostacolo, o se zoppica su terreno soffice o duro.

Controllare piedi e arti: se l'animale zoppica sul terreno duro ma sembra migliorare su quello soffice, se solleva un piede per scaricarlo e farlo riposare o se abbassa la testa quando uno dei piedi tocca il terreno.

È importante verificare le condizioni di stabulazione: se l'animale ha poche opportunità di fare esercizio o se nel box il fondo è molto morbido o fangoso, i muscoli di arti e piedi perdono parzialmente la loro capacità di resistenza meccanica e lo scarso tono muscolare permetterà alle ossa di perdere il corretto allineamento, rendendo il movimento scomodo; quindi l'animale tenderà a muoversi sempre meno, e piedi e arti diventeranno sempre più deboli. Se articolazioni e muscoli non sono danneggiati comunque un rinnovato esercizio su un fondo più fermo migliorierà la condizione.

Per assorbire la pressione del peso e la risposta del terreno durante la deambulazione l'urto è ammortizzato tramite l'elasticità permessa alle ossa dalle rispettive angolazioni: le piccole ossa di carpo e tarso slittano l'una sull'altra, le falangi si abbassano leggermente e le dita si allargano.

Se le ossa degli arti e le falangi non fossero allineate la pressione sarebbe scaricata sui muscoli, che si stirerebbero eventualmente fino a rompersi, e si avrebbe anche un aumento di frizione con usura delle articolazioni.

Un arto con conformazione anomala influisce sul piede negativamente e viceversa, perché se uno dei due è anormale modifica l'equilibrio e la distribuzione del peso sull'altro.

La conformazione della spalla e della groppa influisce su piedi e arti per lo stesso motivo.

Piedi e arti sono tra le prime strutture a degenerare con l'età (soprattutto quelli pelvici); per questo un difetto in queste strutture deve essere considerato particolarmente grave se si realizza in un animale giovane.

Piedi e arti dovrebbero essere osservati mentre l'animale cammina, in quanto il movimento potrebbe rivelare difetti di conformazione non evidenti quando l'animale è in stazione. L'andatura dovrebbe essere fluida, con movimenti compiuti senza sforzo. Osservando il soggetto sia anteriormente che posteriormente, tutti gli arti dovrebbero muoversi liberamente in direzione craniale lungo una linea retta. Se l'animale trascina i piedi, si muove goffamente, o si notano delle deviazioni dalla linea descritta, la causa potrà essere ricercata in un errato trimming del piede, in un'anomalia conformazionale o in un trauma a piede, arto, spalla o pelvi (Lee Owen, 1977).

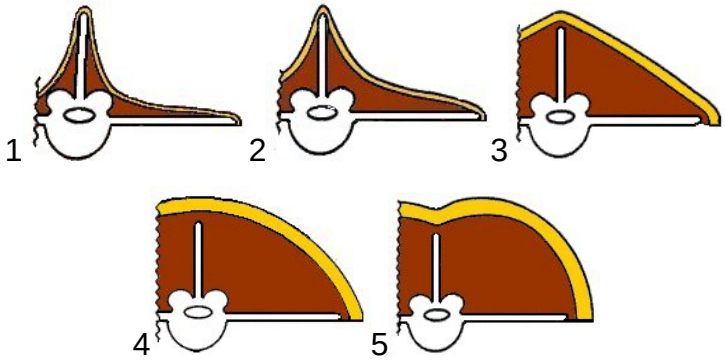
Lo stato nutrizionale viene definito tramite l'assegnazione di un punteggio BCS (Body Condition Score) con valori compresi tra 1 e 5.

Un punteggio di 1 indica un animale estremamente magro, senza riserve di grasso, mentre un BCS di 5 è utilizzato per un animale obeso. Nella maggior parte dei casi un becco sano dovrebbe avere un punteggio compreso tra 2,5 e 4. 1, 1,5 e 2 punti rivelano problemi sanitari o di management.

Per l'assegnazione del punteggio si valutano la regione lombare, lo sterno e la cassa toracica. A livello lombare si stima la quantità di muscolo e grasso che ricopre le vertebre utilizzando la percettibilità dei

processi spinosi e trasversi (fig. 6). Nell'area sternale si controllano la presenza e l'entità del cuscinetto di grasso che qui si trova. Infine si pondera la rilevatezza delle coste (Detweiler et al., 2008).

Fig. 6. Punteggio BCS assegnato valutando la regione lombare della capra.



Si dovrebbe evitare di utilizzare animali troppo magri o grassi, ma una piccola riserva di grasso è necessaria perché durante la stagione riproduttiva è probabile che l'animale perda un po' di peso.

Per quanto riguarda la conformazione dell'addome questo deve essere relativamente ampio in rapporto alla taglia dell'animale, in modo da poter garantire un'adeguata capacità digestiva, forza e vigore all'animale (Lee Owen, 1977).

Poiché alcune patologie muscolari possono essere accompagnate da abbattimento generale, da algia, da ridotta funzionalità, cioè condizioni in grado di ridurre le performance riproduttive, la loro assenza dev'essere accertata.

Per svelare eventuali patologie sistemiche che, seppur indirettamente e magari solo momentaneamente, rendano il becco non adatto alla riproduzione è utile considerare anche:

- Stato del sensorio (temperamento);
- Atteggiamento e segni particolari (facies);
- Cute e connettivo sottocutaneo;
- Mucose apparenti;
- Linfonodi esplorabili;
- Temperatura [temperatura diurna misurata per via rettale: 38,6 +/-0,8 °C];
- Polso (caratteri e frequenza) [70-80 battiti/min];
- Respiro (caratteri e frequenza) [20/30 cicli respiratori/minuto a riposo];
- Grandi funzioni organiche;

(Messeri, Moretti, 1963; Aguggini et al., 2006).

1.4.2 Valutazione dell'apparato riproduttore

Ogni parte componente l'apparato riproduttore andrà sottoposto alle procedure di Ispezione, Palpazione, Percussione e Misurazione.

Le informazioni ottenute dovranno essere interpretate confrontandole alla condizione fisica fisiologica delle singole parti.

Lo scroto

Condurre un esame ispettivo e di palpazione (volume, forma, simmetria, posizione, consistenza, mobilità, temperatura e dolorabilità), eventualmente integrato da esami strumentali (ecografia); l'animale può eventualmente essere sedato o confinato in un travaglio per rendere l'esame più agevole.

Lo scroto, normalmente, è pendulo, soprattutto durante la stagione calda.

La porzione di scroto posta tra i testicoli e la parete addominale (collo) deve essere ben evidente (salvo in caso di freddo intenso) ed ospita il plesso pampiniforme. Un collo corto è un difetto, in quanto costringe il

testicolo in posizione prossima all'addome, compromettendone la termoregolazione. Può rivelarsi utile confermare l’assenza di cicatrici da vasectomia.

Possibili cause d'alterata forma dello scroto:

- Ipoplasia o degenerazione, unilaterale e/o bilaterale;
- Orchite, ascessi e neoplasie;
- Ernia scrotale;
- Torsione testicolare;
- Varicocele;
- Epididimite e/o eccessiva mobilità della coda dell'epididimo;
- Granulomi dell'epididimo.

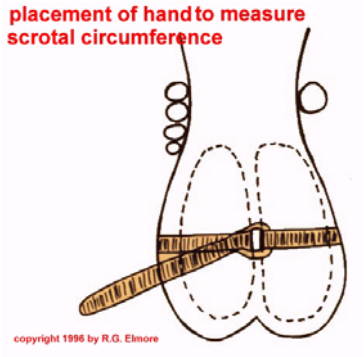
La palpazione si esegue partendo dalla parete addominale verso il basso. L'attaccatura (collo) deve essere priva di sfiancamenti (depositi di grasso e varicocele). La pelle dello scroto deve essere liscia, priva di processi infiammatori o di lesioni; il sottocute (dartos) non deve essere troppo spesso. I testicoli devono essere mobili all'interno dello scroto (privi di aderenze) e non devono essere presenti raccolte tra le due vaginali (ematocele, idrocele). La normale consistenza tesa-elastica diviene elastico-molle-flaccida nelle degenerazioni e atrofie, mentre si ha un aumento della consistenza in caso di fibrosi e lesioni croniche. La corda spermatica deve essere palpata fino al livello dell’anello inguinale per escludere la presenza di contenuto addominale (ernia inguinale scrotale) o anomalie nei vasi spermatici (Pugh, 2000; Youngquist, Threlfall, 2007).

La circonferenza scrotale (C.S.) varia in funzione del peso corporeo (parametri di razza), della maturità sessuale dell’animale e soprattutto della stagione, ed è un parametro a media - alta ereditabilità (Youngquist, Threlfall, 2007). È un affidabile indice di precocità (età del raggiungimento della pubertà) dei figli tanto quanto delle figlie. In altri termini, selezionando elevata C.S. si ottengono figlie più precoci ed anche più fertili (maggior numero di ovulazioni per ciclo estrale) (Soderquist, Hulten, 2006).

Tecniche di misurazione:

- Manuale (fig. 7), con nastro misuratore (facile, ma non sempre accurata);

Fig. 7. Come misurare la circonferenza scrotale con l'ausilio del nastro misuratore.



- Ecografica (poco diffusa, meno agevole, molto accurata).

Quando la spermatogenesi si realizza alla pubertà si verifica un improvviso aumento del diametro tubulare. Poiché la circonferenza scrotale è una misura indiretta della taglia testicolare, un marcato aumento di questo parametro indica l'inizio di spermatogenesi attiva e quindi la possibilità di usare il becco per la riproduzione, eventualmente anche prima di quanto sia normalmente consigliato (Bongso et al., 1982).

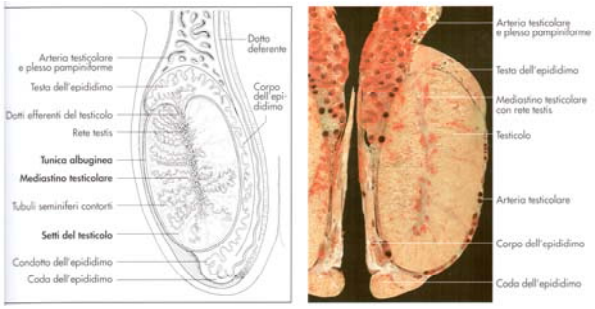
Nel becco le indicazioni esistenti a riguardo suggeriscono che animali di più di 40 kg dovrebbero avere una circonferenza scrotale di almeno 25 cm (Smith, Sherman, 1994).

Il testicolo

I testicoli di un animale maturo hanno forma ovoidale, sono posizionati verticalmente nello scroto e dovrebbero muoversi liberamente al suo interno (fig. 8) (Youngquist, Treljajj, 2007).

Maschi con criptorchidismo unilaterale sono fertili ma dovrebbero essere esclusi dalla riproduzione (Linklater, Smith, 1993).

Fig. 8. Normale contenuto scrotale di ruminante



Tratto da Konig, Liebich, 2002

Epididimo

Segue il margine caudo-mediale del testicolo. Consiste di testa, corpo e coda. La coda è adesa al testicolo mediante il legamento proprio del testicolo e si protende ventralmente dando luogo a un ingrossamento palpabile. Generalmente è possibile palparne anche la testa, ma il corpo è spesso difficile da percepire a causa della sua posizione mediale (Youngquist, Threlfall, 2007).

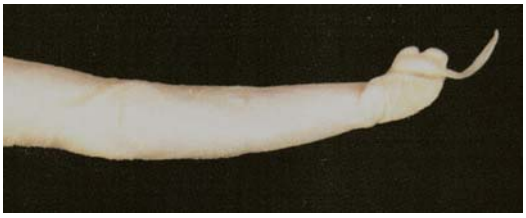
Stabilirne temperatura, taglia, consistenza, simmetria, resistenza e uniformità.

Pene e processo uretrale

Eseguire un'attenta palpazione della parte prepuziale e dell'orifizio prepuziale del pene, esteriorizzarne la parte libera, palpare la flessura sigmoidea. Il processo uretrale solitamente si estende oltre il glande per circa 2,5 cm (fig.9) (Noaks et al., 2001).

Alcuni difetti come la deviazione spirale o l'incapacità di erezione comunque sono riscontrabili solo durante l'accoppiamento (Linklater, Smith, 1993).

Fig. 9. Normale aspetto di pene e processo uretrale nel becco.



Tratto da Konig, Liebich, 2002

Esame rettale

La parte di genitali interni non raggiungibile tramite l'esame esterno dev'essere indagata tramite palpazione per rectum, per quanto generalmente le ghiandole accessorie siano fuori dalla portata di un esame digitale (Linklater, Smith, 1993; Noaks et al., 2001).

1.4.3 Valutazione del seme

Lo scopo per cui viene esaminata la qualità seminale è accertarsi che il numero di spermatozoi funzionalmente normali presente in un eiaculato sia sufficiente ad ottenere gravidanza e che il maschio abbia una capacità di produrre spermatozoi adeguata per garantire un buon tasso di concepimento all'interno del gruppo di femmine che deve montare (in condizione di monta naturale).

Per il prelievo del seme si ricorre all'utilizzo della vagina artificiale (fig. 10) che consiste delle seguenti parti:

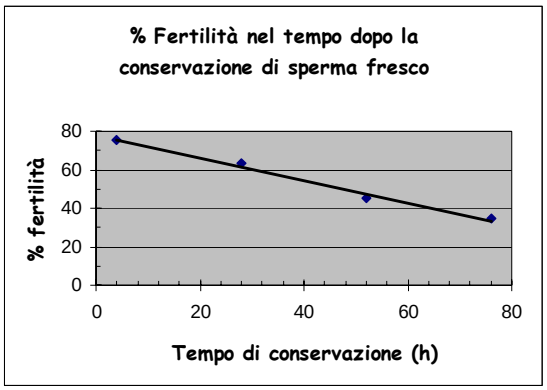
- un tubo di gomma lungo circa 20 cm e di 5 cm di diametro, con una valvola per l'aria e l'acqua;
- un bulbo di gomma a pressione;
- un tubo di lattice interno;
- un imbuto di lattice per la raccolta del seme;
- una provetta graduata per la raccolta, di vetro o plastica, da 10-15ml;
- del lubrificante non spermicida;
- impugnatura di cuoio per migliorare la maneggevolezza e mantenere il calore dell'acqua.

Fig. 10. Componenti della vagina artificiale

La longevità del seme fresco non diluito è di circa 30 minuti, mentre con mestrui salini può arrivare a 10 ore (con potere fecondante immutato); con mestrui a base di latte può raggiungere i 3-5 giorni di sopravvivenza (potere fecondante immutato per le prime 24 ore – fig. 11) e nei mestrui a base di tuorlo d'uovo i 15 giorni.

Il seme refrigerato deve essere utilizzato entro 24 ore dal prelievo. Alla raccolta deve seguire immediatamente l'analisi (n° di spermatozoi, motilità) e la diluzione (tutto a una temperatura costante di 30°C). Il diluitore standard è il latte scremato glucosato (nel diluitore si utilizzano anche antibiotici come streptomicina). Una volta diluito il seme viene raccolto in una provetta identificabile e posto in un becker pieno d'acqua. A questo punto viene posto in una cella frigorifero (4-5°C) e tramite la presenza nel becker stesso di ghiaccioli deve raggiungere la temperatura di 4°C in 90 minuti. A questo punto viene confezionato in paillettes da 0,25 ml conservate a 4°C all'interno di un thermos e inviate all'allevamento in cui verranno utilizzate (Leboeuf et al., 2000).

Fig. 11. Diminuzione della fertilità del seme fresco in rapporto al tempo di conservazione.



Modificato da Leboeuf et al., 2000

Più spesso però nei programmi di A.I. si ricorre alla crioconservazione del seme, che ne permette una sopravvivenza idealmente illimitata. Questa possibilità è particolarmente vantaggiosa perchè nell'allevamento caprino si cerca il più possibile di svincolarsi dalla stagionalità riproduttiva, al fine di ottenere una produzione lattea costante per tutta la durata dell'anno.

Molto importante è maneggiare il seme con cura, se si vogliono ottenere risultati significativi: gli spermatozoi sono molto sensibili al raffreddamento, quindi il seme dovrebbe essere mantenuto a circa 30°C prima e durante l'esame, che comunque deve essere condotto il più rapidamente possibile dopo il prelievo. Per questo stesso motivo è importante anche che il microscopio, il vetrino portaoggetti e quello coprioggetti e il materiale in cui il seme è diluito siano mantenuti a circa 30°C (Noaks et al., 2001).

Il seme è inizialmente *controllato* per la presenza di urina, sangue, pus e materiale estraneo. Si annota il colore (se giallo per esempio indica presenza di riboflavina, se rosato di sangue), l'odore (normalmente non è presente nessun odore particolare) e la consistenza (campioni acquosi sono spesso oligospermici e quelli non omogenei spesso contengono pus).

Si stima il *volume* di sperma ottenuto e la sua *concentrazione* (calcolata tramite emocitometro o spettrofotometro).

Si dà un punteggio alla *motilità*, fortemente influenzata dalla temperatura, il cui controllo si rivela pertanto critico in questa fase. Una goccia di seme viene posta su un vetrino ed esaminata a basso ingrandimento: non è possibile vedere i singoli spermatozoi, ma il movimento di massa (onde multiple ricorrenti e circolari), a cui viene assegnato un punteggio (0 – 5). Si può dunque diluire lo sperma e valutare a maggior ingrandimento la motilità spermatica individuale (motilità progressiva): idealmente la motilità dovrebbe manifestarsi in direzione rettilinea con un caratteristico ondeggiamento della testa e della coda; più la morfologia dello spermatozoo sarà danneggiata più i suoi movimenti si discosteranno da quest'optimum. Viene assegnato un punteggio di motilità sia al seme diluito sia a quello refrigerato, ed è compreso tra 0 e 100 (% di spermatozoi che presentano motilità normale) oppure anch'esso valutato con un punteggio tra 0 e 5 .

La misura della *conta spermatica totale* è data dal prodotto di volume x densità.

Un punteggio di *vitalità* viene assegnato mediante valutazione al microscopio dopo diluizione, sia al seme fresco sia al seme refrigerato (0 – 100%).

La *morfologia* (normalità: > dell'80%) è valutabile tramite striscio di una goccia di seme o colorazione con coloranti citologici normali (Papanicolau, blu di Leishman, Diff Quick, Giemsa, Wright, ecc), "vitali" (Eosina – Nigrosina, Eosina – Blu di Anilina, ecc.), per l'acrosoma o colorazioni fluorescenti (Pugh, 2000; Noaks et al., 2001; Youngquist, Threlfall, 2007).

L'analisi del seme finora descritta fornisce abbastanza informazioni per riconoscere becchi di fertilità molto scarsa, ma è stata sempre più considerata inefficiente nel discriminare tra livelli di fertilità moderati e alti, anche perchè la correlazione con il tasso di fecondazione è solo mediocre (Watson, 1990). Per questo motivo tale valutazione può essere valida all'interno di un iter che mira ad identificare maschi potenzialmente infertili, ma se si vuole un'accurata predizione della fertilità sono necessari esami più sofisticati.

Allo scopo di migliorarne l'accuratezza sono stati impiegati molti test di funzionalità spermatica, con successo variabile. Abbastanza diffusa nella pratica veterinaria è l'analisi computer-assistita delle caratteristiche degli ondeggiamenti degli spermatozoi (C.A.S.A.), della quale è stata dimostrata l'alta correlazione con la fertilità. Negli ultimi anni sono state anche messe a punto nuove e più efficienti colorazioni. L'innovazione più recente deriva dallo sviluppo della fertilizzazione in vitro, che ha permesso la valutazione della funzionalità tramite induzione in vitro della reazione acrosomiale (alta correlazione con la fertilità) (Noaks et al., 2001).

Parametri indicativi per la valutazione del seme di becco (Youngquist, Threlfall, 2007):

- Volume: 0,5-1,5 ml;
- Concentrazione spermatica 2-5 milioni spermatozoi/ml;
- 80% motilità spermatica;
- 70-90% normale morfologia spermatica.

Parametri minimi richiesti per l'utilizzo del seme (AITECH, 2003):

- numero di SPZ/eiaculato: 1 miliardo;
- motilità: 3 (scala 0-5) o 60%;
- morfologia: massimo 30% di anomalie;
- assenza di cellule o materiale infiammatorio;
- % spermatozoi vitali: 50%.

Un altro tipo di controllo qualitativo necessario alla produzione di seme per le campagne di AI è l'accertamento dello *stato sanitario* dell'animale che produce il seme stesso (direttiva 92/65 della Commissione Europea). Nei 30 giorni precedenti la raccolta del seme il becco deve essere sottoposto con esito negativo ai test per brucellosi, epididimite contagiosa (Brucella ovis) e malattia di Border (AITECH, 2003).

1.4.4 Valutazione della libido

In allevamenti in cui si utilizzi la monta naturale, l'identificazione di becchi in grado di accoppiarsi con un largo numero di capre in un breve periodo di tempo può portare significativi benefici alla fertilità totale del gregge. Questi benefici sono l'aumento della pressione selettiva conseguente all'utilizzo di pochi maschi e di conseguenza la diffusione maggiore di materiale genetico desiderabile e la diminuzione dei costi di mantenimento dei becchi. Anche per la raccolta del seme in vagina artificiale vanno selezionati animali capaci di individuare la femmina, montarla ed eiaculare nel più breve tempo possibile.

È preferibile osservare i comportamenti riproduttivi (o eseguire la raccolta del seme) prima di sottoporre l'animale allo stress dell'esame fisico (Noaks et al., 2001).

La scelta delle condizioni in cui osservare il comportamento riproduttivo è importante: i becchi, per quanto generalmente dimostrino elevata libido, spesso rifiutano di montare una capra in estro in presenza di un osservatore umano, e spesso si deve dar prova di notevole tenacia e pazienza prima che si verifichi un accoppiamento. Inoltre animali stressati da un recente trasporto generalmente sono refrattari alla monta per un certo tempo (Noaks et al., 2001).

La valutazione della libido e della capacità di monta è usata ampiamente nei tori ma ancora poco per le altre specie, inclusi i caprini. Nei tori l'osservazione del comportamento riproduttivo ha suggerito che i test impiegati possano avere valore in parte predittivo della fertilità; inoltre la libido è considerata altamente ereditabile, per cui la selezione di animali per questo carattere è probabile esiti in un complessivo aumento in questo aspetto delle performance dell'intera mandria (Noaks et al., 2001). In quest'ottica applicarli anche alle altre specie può essere un importante ausilio nella selezione dei riproduttori.

Sono stati proposti diversi test per l'accertamento della libido e della capacità di monta, utilizzando sia femmine in estro sia non in estro, e dando un punteggio al numero e al vigore degli accoppiamenti o dei tentativi di monta. Molti report hanno mostrato che alti punteggi ai test sono associati a buone performance riproduttive (Makarechian, Farid, 1985), ma altri si sono dimostrati più cauti e alcuni studi infine non sono riusciti a dimostrare una relazione tra test e fertilità (Crichton et al., 1987) (probabilmente perché la libido non è che una delle molte variabili a cui si deve la fertilità di un animale ndr.).

Infine in campo buiatrico è stato concluso (Chenoweth, 1986; 1997) che né l'esame clinico né la valutazione della libido possono essere usati separatamente per la valutazione della validità riproduttiva, ma se sono presi in considerazione i risultati di entrambi è meno probabile che sfuggano tori infertili.

Esistono diversi studi che in ambito buiatrico e in andrologia ovina propongono metodi di misurazione della libido.

Un test molto semplice prevede di introdurre in un recinto una bovina in estro con il toro da testare per un periodo di 10 -15 minuti. Se si verificano una o più monte in questo intervallo di tempo è improbabile che la libido rappresenti un problema. Se invece il toro fallisce si dovrebbe ri-testarlo. Se in entrambe le occasioni non si verificano monte ci sono serie motivazioni per mettere in dubbio la sua libido (Noaks et al., 2001).

Nell'ariete si può includere il maschio in un recinto in presenza di 5 pecore in estro indotto per una durata di 20 minuti. I comportamenti da registrare durante l'osservazione sono: annusamenti della regione vulvare (1 punto), monte senza penetrazione o eiaculazione (3 punti), monte complete con penetrazione ed eiaculazione (10 punti). Con questi dati si può derivare matematicamente un indice di libido per ogni ariete, in modo tale che punteggi maggiori identifichino maggior attività sessuale. L'algoritmo somma i singoli punteggi tenendo anche conto del tempo di latenza per la manifestazione dei singoli comportamenti. Parallelamente si può produrre anche un "mating index" che tenga conto solo degli accoppiamenti completi (Schanbacher, Lunstra, 1976).

Alternativamente si può includere in un recinto l'ariete in presenza di due femmine in estro e due maschi (per stabilire anche un eventuale orientamento omosessuale abbastanza diffuso nella specie ovina) per una durata di 30 minuti. Gli atteggiamenti da registrare sono: annusamenti, raspate sul terreno, vocalizzazioni, flehmen, monte, eiaculazioni (Resko et al., 1996).

Un altro metodo prevede l'attribuzione di alto (HP) o basso (LP) potenziale riproduttivo in base al superamento o meno di una soglia minima di numero di monte sommando il risultato di ripetuti test (durata di 30 minuti). Già così si possono scartare gli individui con libido più scarsa. Per selezionare i migliori si sottopongono in seguito gli HP a 9 giorni di test in un recinto con 30 pecore e si considerano il numero di monte e di eiaculazioni totali (Perkins et al., 1992).

L'ariete può anche essere posto in contatto con la pecora in estro per 10 minuti e in questo periodo si registra la latenza alla monta, la

frequenza di monta, la latenza di eiaculazione, la frequenza di eiaculazione e l'intervallo post-eiaculatorio (Perkins, Roselli, 2007).

Un altro studio prevede di osservare il comportamento riproduttivo durante 15 minuti in cui l'ariete viene posto in contatto con tre pecore in estro indotto. Dopo 3 ore di riposo si ripete il test. L'intera procedura va ripetuta il giorno seguente. Perché il maschio manifesti una libido soddisfacente deve avere un'erezione, manifestare una monta entro 10 minuti, accoppiarsi ed eiaculare. Arieti che non si siano accoppiati con almeno 10 delle 12 pecore presentate sono considerati sicuramente inattivi (Fthenakis et al., 2001).

Infine è possibile includere l'ariete in un recinto di 6m x 6m con quattro pecore in estro. Il primo giorno si numerano i tentativi di monta e le eiaculazioni avvenuti nell'arco di 20 minuti, e nei tre giorni successivi si conducono test con le stesse osservazioni ma della durata di un'ora l'uno (Kilgour, Whale, 1980).

Per la valutazione della libido si può ricorrere anche a misurazioni ottenute durante la raccolta del seme in vagina artificiale; Singh e Pangawkar (1989) hanno proposto un metodo per ottenere tale scopo nel toro (tabella 3).

Tabella 3. Metodo proposto da Singh e Pangawkar (1989) per la valutazione della libido nel toro durante la raccolta del seme in vagina artificiale

Libido	Approccio alla regione perianale	Indifferente	0
		Letargico	1
		Entusiastico	2
	Erezione del pene	Assente	0
		senza sfoderamento	1
		con sfoderamento	2
Mating behaviour	Approccio alla regione perianale	nessun interesse	0
		Lento	1
		Impaziente	2
	Monte	senza protrusione	0
		Protrusione incompleta	1
		Protrusione completa	2
	Spinta copulatoria	Nessuna	0
		Debole	1
		Forte	2

1.4.4.1 Valutazione della libido nel becco

Il comportamento sessuale dei becchi si esplicita in un pattern ben definito di passi successivi, che includono la ricerca attiva di femmine in estro, il corteggiamento, la monta, la penetrazione e l'eiaculazione. Dopo aver trovato una femmina recettiva il becco manifesta il comportamento di corteggiamento tipico della specie: scalcia, raspa il terreno con l'arto anteriore, annusa la femmina, vocalizza e fa il flehmen. Se la capra rimane immobile il becco compie un paio di tentativi di monta, seguiti da una monta con penetrazione del pene in vagina. L'eiaculazione segue rapidamente ed è caratterizzata da una forte spinta pelvica con un repentino movimento all'indietro della testa. Dopo l'eiaculazione il becco lascia la posizione di monta e manifesta un periodo di refrattarietà che va da pochi minuti a poche ore (Youngquist, Threlfall, 2007).

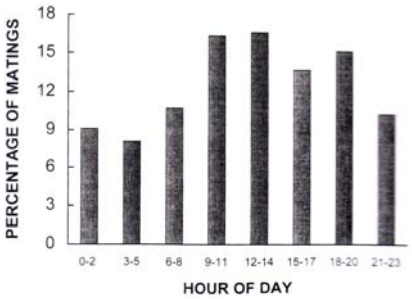
Il comportamento sessuale è influenzato dal livello di androgeni, come pure dalla stagione, dalla presenza di eventuali becchi dominanti, dallo stato nutritivo, da eventuali patologie o stress. Uno studio (Shaunbacher, Lunstra, 1976) ha però dimostrato che alcuni individui, indipendentemente dalla produzione ormonale, hanno una libido più intensa rispetto alla maggior parte degli altri che vivono nelle stesse condizioni di allevamento: questo suggerisce che l' "aggressività sessuale" sia una caratteristica intrinseca per la quale la selezione genetica possa essere utile.

La presenza di becchi dominanti può inibire le manifestazioni riproduttive, ma se l'altro maschio è percepito come un potenziale competitore la reazione sarà una performance più efficiente (Price et al., 1998).

Importante, in test che riproducono le condizioni di allevamento, è fornire un numero adeguato di femmine (normalmente se si ricorre alla monta naturale il rapporto M/F in allevamento è 1/25): uno studio del 2000 (Mellado et al.) ha evidenziato che se il numero di femmine è ridotto si può verificare l' "accanimento" del becco su una in particolare, se il numero è eccessivo il maschio farà fatica ad individuare le femmine in

estro. Lo stesso studio ha inoltre evidenziato come l'attività riproduttiva in campo non sia uniformemente distribuita nell'arco della giornata, ma sia maggiore dall'alba a mezzogiorno, per cui potrebbe essere indicativo sottoporre gli animali a verifica durante questo periodo della giornata.(fig. 12).

Fig. 12. Andamento dell'attività riproduttiva nell'arco della giornata.



Tratto da Meillado et al., 2000

Per la valutazione della libido durante l'utilizzo della vagina artificiale Zarazaga et al. (2009) hanno proposto di valutare la latenza dell'eiaculazione quando al becco viene presentata una capra in estro indotto.

1.5 Limiti dell'approccio tradizionale

Nel toro la sensibilità dell'esame andrologico nella sua forma più tradizionale è stata messa in dubbio: sebbene il 20-40% dei tori in una popolazione non selezionata possa avere scarsa fertilità, solo pochi sono completamente sterili, e di fatto sono gli unici che si riesce a riconoscere; il metodo rivela infatti poca efficacia nell'individuazione di quelli sub-fertili (Kastelic, Thundathil, 2008).

Nell'applicazione alla specie caprina di un esame andrologico si deve tener conto del fatto che nella maggior parte delle razze allevate a latitudini temperate (>35°) e in alcune subtropicali (25-25°) si osserva un comportamento riproduttivo stagionale (Leboeuf et al., 2008).

La "stagione riproduttiva" va dall'inizio dell'autunno alla fine dell'inverno. Questo avviene perché la diminuzione della quantità di luce che si verifica in tale periodo stimola il rilascio di gonadotropine, che supportano la

gametogenesi e la secrezione di ormoni steroidei gonadici sia nei maschi sia nelle femmine.

Al di fuori di questo periodo l'attività sessuale maschile è fortemente rallentata, in alcuni individui quasi inesistente. Queste variazioni nel comportamento sessuale sono associate a riduzioni importanti della dimensione testicolare e alla diminuzione del volume e della concentrazione dell'eiaculato; i parametri seminali sono caratterizzati inoltre da un sostanziale peggioramento della motilità e da un aumento delle anomalie spermatiche(+10%) (Manfredi et al., 1998).

Con tali premesse un esame come quello descritto finora non è attendibile al di fuori della stagione riproduttiva; è necessario rimandarlo a quando questa è già iniziata e un giudizio negativo sull'animale comporta una perdita economica molto maggiore per l'acquirente.

1.6 Parametri innovativi per la valutazione andrologica

1.6.1 Esame ecografico

L'ecografia è una tecnica non invasiva e innocua utile per la diagnosi o la conferma di anomalie a livello scrotale e testicolare (Ahmad et al., 1991).

Viene frequentemente applicata per completare il BSE nel toro, nello stallone, nell'ariete, ma il suo utilizzo non è ancora stato standardizzato o introdotto nella pratica routinaria.

L'anatomia pendula dei genitali maschili dei becchi li rende facilmente accessibili all'esame ecografico. La scansione e l'interpretazione dei rilievi ultrasonografici non presentano particolari difficoltà perchèi testicoli sono facili da indagare per la loro posizione, non hanno altri organi vicini, sono simmetrici e facilmente comparabili tra loro (Gouletsou et al., 2003).

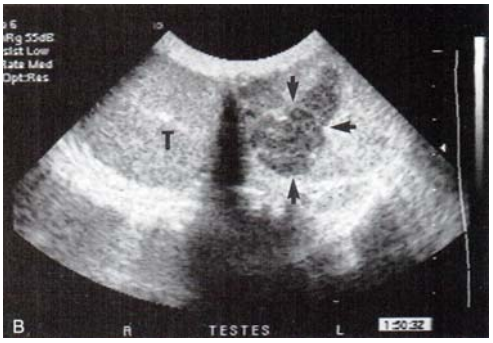
Negli arieti alcuni ricercatori (Bruere, West, 1993) considerano che l'esame clinico dei genitali permetta di diagnosticare la maggior parte delle anomalie, ma recentemente è stata messa in discussione l'accuratezza di tale metodo. Attualmente in alcuni Paesi come Francia e Spagna la valutazione del seme è considerata la metodologia di indagine

più significativa; però non è sempre applicabile nelle condizioni pratiche, essendo costosa e richiedendo la disponibilità di un laboratorio. Inoltre fuori dalla stagione riproduttiva la produzione spermatica è ridotta e la qualità del seme inferiore. L'esame ecografico può essere perciò usato in modo complementare a quello clinico, aumentandone così l'accuratezza. Molti veterinari nella pratica di gestione delle greggi usano scanner portatili per la diagnosi di gravidanza, e questo può essere sfruttato anche per l'esame dei genitali maschili (Gouletsou et al., 2003).

1.6.1.1 Utilità clinica

L'utilizzo dell'ecografia testicolare permette di ottenere la conferma di un sospetto diagnostico in caso di ascessi, ernie scrotali e neoplasie (fig. 13); sono tutte condizioni che all'esame clinico possono essere evidenziate tramite palpazione (Ahmad et al., 1991).

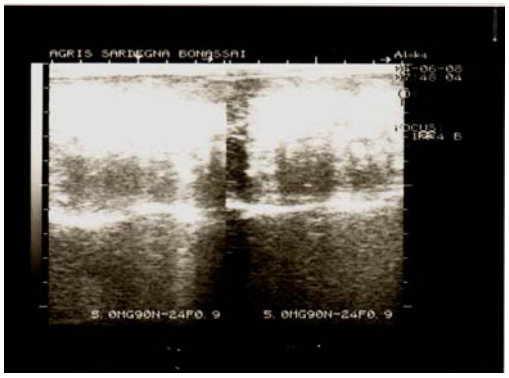
Fig. 13. Visualizzazione di una massa neoplastica testicolare tramite esame ecografico



Tratto da Nyland, Mattoon, 2002

Molto più importante è però il suo ruolo nella diagnosi di alterazioni degenerative (fig. 14), epididimiti, cisti e granulomi spermatici; sono lesioni evidenziabili molto prima con l'ecografia rispetto all'esame clinico o del seme (Ahmad et al., 1993; Karaca et al., 1999; Ahmad et al., 2000).

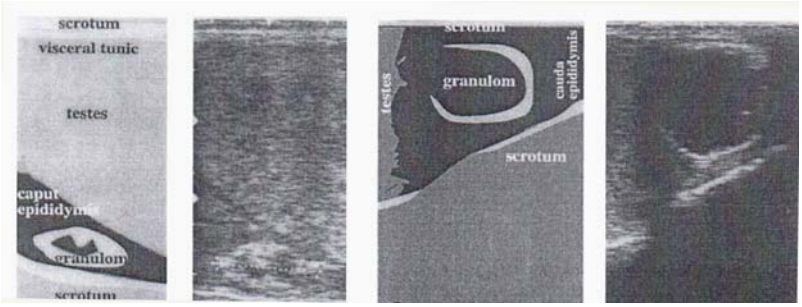
Fig. 14. Mineralizzazione testicolare.



Spesso la degenerazione testicolare evolve a mineralizzazione, ancor più facilmente rilevabile all'esame ecografico.

L'importanza di questo aspetto è evidente se si considera che negli animali la degenerazione testicolare è frequentemente riportata come comune causa di infertilità, e nei becchi questo è particolarmente vero, considerando che è stata riportata (Iyer, Rajn, 1979) un'incidenza del 16,9% in questa specie. E sebbene le lesioni testicolari siano la causa più importante di scarsa fertilità, i granulomi spermatici (fig. 15) sono scarsamente nominati nei lavori scientifici, probabilmente perché possono essere identificati solo tramite ultrasonografia (Ahmad et al., 2000).

Fig. 15. Aspetto ecografico dei granulomi spermatici



Tratto da Karaca et al., 1999

Il riscontro di tali lesioni durante ecografie di routine, in animali con testicoli apparentemente normali e normale qualità del seme, può pertanto anche non avere rilevanza clinica, ma la loro abbondanza in un maschio infertile con altri segni di degenerazione testicolare è da considerarsi probabilmente significativo (Ahmad, 1993).

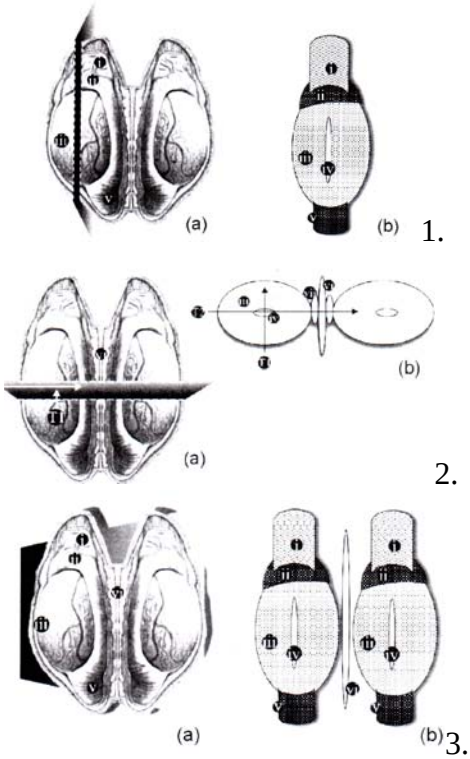
L’ausilio dell’ecografia si rivela utile anche nella diagnosi di neoplasie (soprattutto sertoliomi) in testicoli ritenuti (Linklater, Smith, 1993).

Infine, oltre al suo utilizzo per la diagnosi di patologie, l’uso dell’ecografia permette di stabilire le dimensioni testicolari con molta più precisione del metodo manuale; essendo questo un parametro fondamentale si evince l’importanza sicuramente non trascurabile dell’applicazione dell’ultrasonografia (Smith, Sherman, 1994).

1.6.1.2 Aspetto ecografico

Un approccio sistematico alla visualizzazione testicolare può contribuire a compiere questa parte della valutazione andrologica in modo più accurato. Gouletsou et al. (2003) hanno proposto uno schema per l’ariete facilmente adattabile all’esame ecografico testicolare delle altre specie; lo scroto e il suo contenuto devono essere visualizzati prima secondo una sezione sagittale, quindi trasversale e infine longitudinale (fig. 16).

Fig. 16. Sezioni ecografiche applicate ai testicoli di ariete

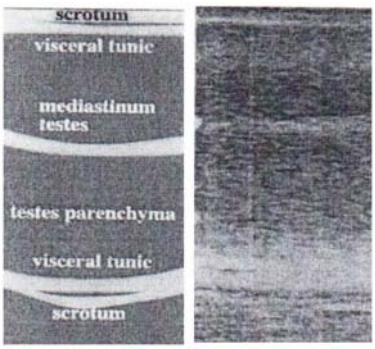


Sezione sagittale 1), trasversale 2) e longitudinale 3)
(a)in situ, (b) rappresentazione schematica
(i)plesso pampiniforme, (ii) testa dell’epididimo, (iii) parenchima testicolare, (iv) mediastinum testis, (v) coda dell’epididimo,
(vi) setto scrotale, (vii) corpo dell’epididimo (tratto da Gouletsou et al., 2003)

Il testicolo appare come una struttura omogenea e moderatamente ecogenica.

Il mediastino è collocato centralmente ed è rappresentato da una linea (da un punto nella sezione trasversale) iperecogena la cui ecogenicità aumenta con l'età (fig. 17).

Fig. 17. Normale aspetto ecografico del contenuto scrotale



Tratto da Karaca et al., 1999

Chiazze iperecogene variabili sono occasionalmente osservabili e sono probabilmente causate da fasce di tessuto connettivo che si diramano dal mediastino e si estendono tra le sezioni del parenchima testicolare.

La tunica e la capsula testicolari sono visibili come una linea distinta iperecogenica che avvolge il parenchima testicolare.

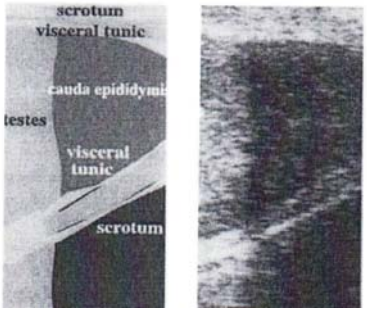
È inoltre visibile un sottile strato anecogeno di fluido, presumibilmente tra i due strati della tunica vaginalis. Le lamine parietale e viscerale infatti sono visibili solo se è presente del fluido tra esse, altrimenti non sono distinguibili dalla cute scrotale.

La cute dello scroto forma una sottile struttura periferica iperecogenica, circondando l'immagine dei genitali.

Il setto intertesticolare appare come una linea intensamente ecogenica tra i testicoli.

Dei tre segmenti dell'epididimo la coda è l'unica parte che si possa visualizzare interamente e distintamente (fig. 18). In animali sessualmente maturi essa è una struttura più eterogenea dei testicoli e anche meno ecogenica.

Fig 18. Normale aspetto ecografico della coda dell'epididimo

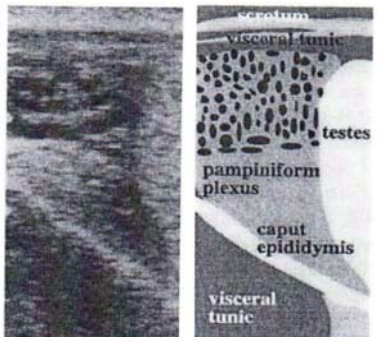


Tratto da Karaca et al., 1999

All'interno del parenchima epididimale sono visibili anche alcune aree anaecogene, che sono probabilmente i duttuli efferenti. La testa dell'epididimo non si visualizza sempre interamente perché è a volte mascherata dal plesso pampiniforme; è meno ecogenica del parenchima testicolare e di aspetto omogeneo. Il corpo dell'epididimo non si riesce a visualizzare, a causa della mobilità di testicolo ed epididimo nello scroto: pur essendo l'epididimo normalmente strettamente adeso alla faccia caudo-mediale del testicolo, può scivolare più medialmente verso il rafe testicolare quando lo scroto viene manipolato durante l'esame.

Il plesso pampiniforme (fig 19) è facilmente visualizzabile come numerose strutture tubulari convolute e lucenti, chiaramente separate dal testicolo, e si presenta come una struttura conica con la base rivolta verso il polo prossimale del testicolo. È facilmente distinguibile dal parenchima testicolare perché meno ecogenico e maschera la parte superiore della testa dell'epididimo.

Fig 19. Normale aspetto ecografico del plesso pampiniforme



Tratto da Karaca et al., 1999

Se i testicoli vengono visualizzati all'interno dello scroto in modo tale che uno sia nella parte prossimale del campo visivo, e l'altro in quella più distale, quello più lontano dalla sonda è sempre meno ecogenico a causa dell'attenuazione del fascio ultrasonoro. Per questo motivo le immagini ecografiche dei testicoli dovrebbero essere interpretate sulla base dell'aspetto del testicolo che si trova più prossimalmente alla sonda (Ahmad et al. 1991; Gouletsou et al., 2003).

1.6.1.3 Valutazione della "pixel-intensity" nell'ecografia testicolare

Secondo Gabor et al. (1998) l'analisi visiva di ecografie testicolari ha valore limitato, perché legata alla sensibilità dell'occhio umano; essi propongono piuttosto di sfruttare l'ecografia, tramite l'analisi computerizzata delle immagini, per valutare la capacità spermatogenica del testicolo.

Anche altri studi condotti sul toro (Kastelic et al., 2001; Arteaga et al., 2005) hanno proposto l'utilizzo dell'ecografia, attraverso l'analisi della "pixel intensity", come mezzo per indagare la qualità seminale.

Un'immagine ecografica è composta da un'insieme di elementi (pixel), ognuno dei quali rappresenta una determinata densità del tessuto, tradotta in diversa intensità rispetto a una gamma di grigi (dal bianco al nero). Mentre Kastelic asserisce che grazie all'indagine computerizzata dell'intensità in termine di pixel sia possibile trovare una corrispondenza con la produzione spermatica giornaliera (se l'immagine diventa più chiara, e quindi più densa, la produzione spermatica aumenta), Arteaga sostiene che un'alterata intensità dei pixel rifletta modificazioni degenerative testicolari acute, ma non possa essere associata alla qualità del seme prodotto.

Gli autori i cui lavori valutano l'analisi computerizzata delle immagini ecografiche concordano comunque nell'asserirne l'utilità in caso di inserimento nel tradizionale esame andrologico.

1.6.2 Esame ematobiochimico e profilo ormonale tiroideo

L'esame ematobiochimico, soprattutto unitamente ai valori degli ormoni tiroidei, è utile per conoscere lo stato metabolico di un animale; nella valutazione di un riproduttore può essere particolarmente interessante perchè durante la stagione riproduttiva il becco è chiamato a sostenere un notevole sforzo in termini di dispendio energetico.

Un'adeguata funzionalità tiroidea è indispensabile per una normale spermatogenesi ed attività sessuale nei maschi di tutte le specie. Il legame del T3 alle cellule del Leydig induce la sintesi di un fattore proteico che a sua volta stimola il rilascio di androgeni. La tiroide è inoltre necessaria per la sensibilità al fotoperiodo, svolgendo un ruolo permissivo per i meccanismi neuroendocrini endogeni coinvolti nel passaggio all'anestro stagionale.

Benchè la T4 sia maggiormente rappresentata nel sangue circolante, viene considerata come precursore della T3, l'ormone biologicamente attivo; la conversione da una forma all'altra avviene mediante deiodazione nei tessuti periferici.

L'attività tiroidea è notevolmente influenzata da fattori di ordine ambientale, quali temperatura, umidità relativa, fotoperiodo, disponibilità alimentare, nonché dall'ambiente interno dell'organismo, in particolare dalle richieste e disponibilità energetiche.

Gli ormoni tiroidei determinano uno spiccato incremento del metabolismo basale, della produzione di calore e del consumo di O_2.

Sul metabolismo glucidico l'azione si estrinseca sia direttamente che attraverso la modulazione dell'intervento di altri ormoni, quali insulina e catecolamine; inoltre gli ormoni tiroidei stimolano l'assorbimento intestinale dei carboidrati, la glicogenolisi e la gluconeogenesi.

Influenza notevole si ha anche sul metabolismo dei lipidi, con riduzione delle riserve adipose; gli acidi grassi liberati dalla lipolisi vengono ossidati per produrre ATP, cosicchè diminuiscono i tassi plasmatici di trigliceridi, fosfolipidi e colesterolo.

Per loro azione si verifica un incremento sia della sintesi che del catabolismo delle proteine: proteine strutturali, enzimi, ormoni. Inizialmente la T3 stimola l'accrescimento e l'anabolismo proteico; oltre un certo punto critico i consumi energetici diventano un fattore limitante, per cui prevalgono gli effetti catabolici (Aguggini et al.,1998).

1.6.3 Valori ematici di testosterone

La libido dipende primariamente dagli ormoni androgenici, che permettono l'espressione di un comportamento aggressivo e l'accoppiamento. Per quanto sia chiara la dipendenza del comportamento maschile dagli androgeni, c'è stato molto dibattito sulla relazione tra la concentrazione assoluta di androgeni e la libido: alcuni hanno contestato un ruolo permissivo degli androgeni, mentre altri hanno dimostrato correlazioni positive tra le concentrazioni di testosterone e la misurazione della libido (Noaks et al., 2001).

Legato al comportamento sessuale è anche lo stimolo alla produzione di specifiche sostanze odorose, i feromoni sessuali. Nel becco questi feromoni androgeno-dipendenti sono acidi grassi a corta catena e ramificati.

Tra gli studiosi non c'è una visione concorde sull'influenza degli stessi ormoni sulla qualità del seme prodotto, per quanto sia riconosciuto il loro ruolo indispensabile per il mantenimento della spermatogenesi (Aguggini et al., 1998).

1.7 Trasferibilità del protocollo alla specie caprina in quanto tipicamente stagionale

La stagionalità riproduttiva della specie caprina è un ostacolo all'allevamento perchè impedisce un'omogenea produzione di latte e capretti durante l'arco dell'anno. Questo problema è stato in parte aggirato attraverso l'utilizzo di trattamenti ormonali e fotoperiodici e tramite l'effetto maschio nella femmina, e con trattamenti fotoperiodici o produzione di seme congelato nel maschio. Infatti l'utilizzo nei becchi di trattamenti fotoperiodici permette di eliminare il problema della

stagionalità della produzione spermatica. Sviluppati inizialmente nell'ariete, i cicli fotoperiodici accelerati, basati sull'alternanza tra 1-2 mesi di giorni lunghi (16 h di luce:8 h di buio) e 1-2 mesi di giorni brevi (8 h di luce:16 h di buio), aboliscono le variazioni stagionali del peso testicolare e della produzione spermatica. Becchi Alpini e Saanen, sottoposti per 3 anni consecutivi a questi trattamenti fotoperiodici, presentarono un considerevole aumento di tutti i parametri della produzione spermatica, se paragonati con becchi di controllo mantenuti a fotoperiodo naturale (Delgadillo et al., 1993; Leboeuf et al., 2008).

È però evidente che l'applicazione del trattamento fotoperiodico richiede mesi di tempo, e sfruttarlo per poter anticipare l'esame andrologico non sarebbe praticabile: applicarlo ai giovani prima della loro prima stagione riproduttiva spesso significherebbe effettuare la valutazione quando ancora non hanno raggiunto la pubertà.

Alcuni studi riguardanti pecore e capre però hanno ottenuto l'anticipazione dell'attività riproduttiva tramite "effetto femmina" (Walkden-Brown et al., 1994).

Nelle razze stagionali di pecora e capra l'introduzione di maschi durante la stagione non-riproduttiva può indurre attività ovarica ciclica nelle femmine con un sostanziale anticipo rispetto alla ciclicità spontanea. Questa risposta, conosciuta come "effetto maschio" è ampiamente sfruttata per anticipare e sincronizzare la riproduzione, e la fisiologia che ne è alla base è stata studiata estesamente. Si è scoperta però anche l'esistenza di un analogo "effetto femmina" nei maschi di tali specie, tramite l'esposizione a femmine in estro, che porta a un rapido aumento nella secrezione di LH (e quindi di testosterone) nel maschio stimolandone così la ripresa dell'attività riproduttiva (Walkden-Brown et al., 1994).

Poiché l'esposizione a femmine in estro chiaramente migliora la capacità dei becchi di indurre ovulazione in femmine anovulatorie, Walkden-Brown et al. hanno suggerito che l'effetto femmina possa essere una componente di un circolo auto-incrementante di stimolazione, che

può essere iniziato da entrambi i sessi. Questo circolo può avere importanza considerevole per avviare e sincronizzare l'attività riproduttiva in specie e razze che manifestano un considerevole grado di opportunismo riproduttivo.

Anche nell'effetto femmina, come nell'effetto maschio, sono fondamentali la qualità e la quantità di stimoli forniti per ottenere il "risveglio" dell'attività riproduttiva; negli esperimenti pertanto è bene che il contatto fisico sia garantito (Price et al., 1998).

Per monitorare l'efficacia di tale effetto in questi studi si è ricorso a prelievi di sangue seriali per la determinazione dei livelli di testosterone: si considerava positiva la risposta all'introduzione delle femmine quando si rilevava un aumento significativo della secrezione di LH e testosterone rispetto al periodo pre-trattamento.

1.8 Obiettivi

Il presente lavoro si propone di standardizzare l'approccio alla valutazione del potenziale riproduttivo del becco, con particolare riferimento a:

- Valutazione clinica e strumentale dello stato fisico generale e dell'apparato riproduttore;
- Valutazione dell'omeostasi metabolico-ormonale dell'animale;
- Valutazione della qualità del seme;
- Valutazione della libido.

Viene inoltre descritto un protocollo che permetta di anticipare l'accertamento alla tarda stagione anaestrale.

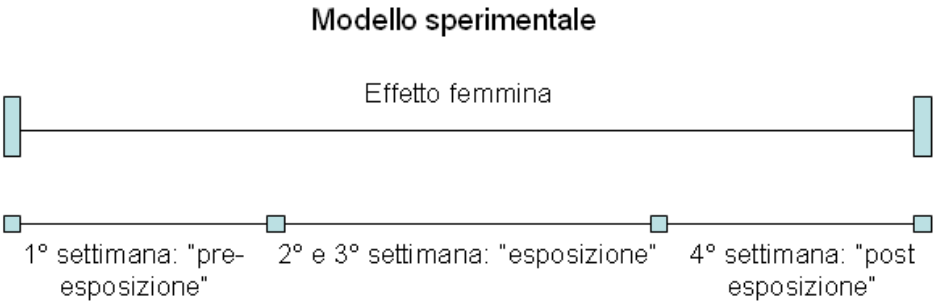
2 MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso il Dipartimento di Ricerca delle Produzioni Animali dell'AGRIS, ad Olmedo in Sardegna, nel periodo intercorrente tra il 31 maggio e il 7 luglio del 2008.

Gli otto becchi utilizzati per lo studio erano stabulati singolarmente in box di circa 2m x 2m, posti all'interno di un capannone (fig. 20).

Fig. 20. La stalla di stabulazione dei becchi dell'esperimento

Per poter anticipare la valutazione alla fine della stagione non riproduttiva si è messo a punto un protocollo che sfruttasse l' "effetto femmina".

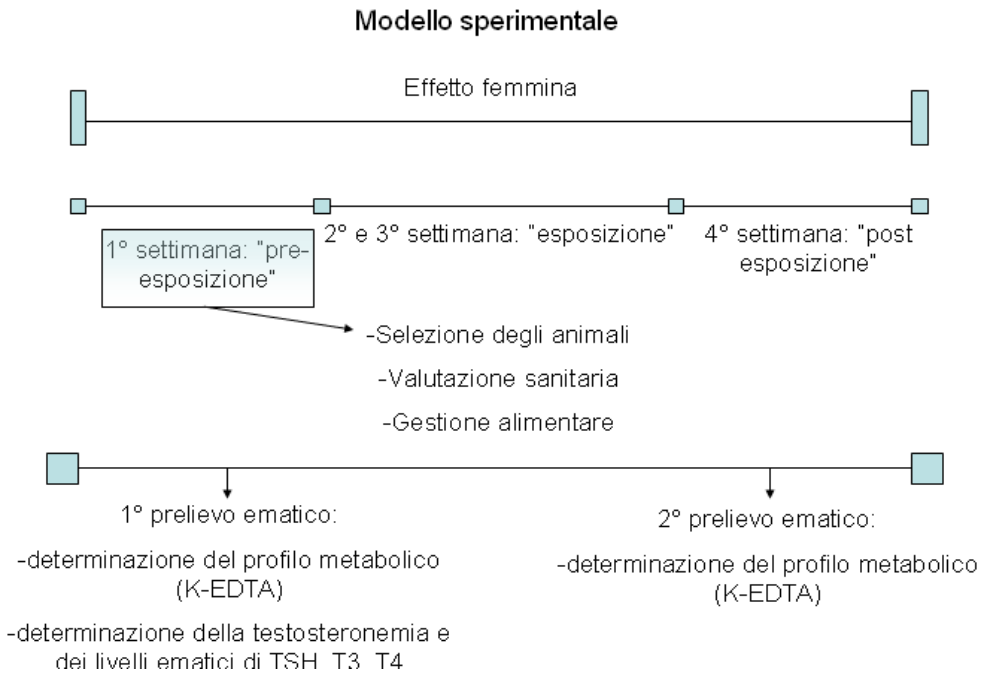


Per ottenere l' "effetto femmina" è necessaria la presenza di una capra in estro indotto. A questo scopo è stata utilizzata una capra di razza sarda a cui è stata impiantata (ore 12.00) una spugna intravaginale di FGA Chrongest 45mg®, sostituita da una seconda spugna il sesto giorno e rimossa la sera dell'undicesimo giorno (ore 20.00); 600 UI di PMSG sono stati somministrati la sera del nono giorno (ore 20.00). La capra è stata

quindi presentata ai maschi la mattina del tredicesimo giorno dall'impianto della prima spugnetta (16 giugno; ore 9.30).

Lo stesso tipo di protocollo è stato utilizzato successivamente anche con le cinque capre di razza sarda utilizzate nelle prove di libido.

2.1 1ª settimana: "pre-esposizione"



2.1.1 Selezione degli animali

Becco n°1: razza sarda, 1,5 anni, vasectomizzato.

Becco n°2: razza sarda, 1,5 anni.

Becco n°3: razza sarda, 6,5 anni, vasectomizzato.

Becco n°4: razza sarda, 2,5 anni.

Becco n°5: incrocio razza sarda x maltese, 2,5 anni.

Becco n°6: incrocio razza sarda x maltese, 4,5 anni.

Becco n°7: razza sarda, 1,5 anni.

Becco n°8: razza maltese, 5,5 anni.

L'età media degli animali era circa 3 anni e non erano presenti né becchi prepuberi né animali normalmente esclusi dalla riproduzione perché vecchi.

Gli otto becchi a disposizione per l'esperimento sono stati posti nelle migliori condizioni fisiche e nutrizionali per eliminare l'eventuale interferenza di tali fattori sui risultati ottenuti.

All'inizio dell'esperimento a tutti gli animali sono stati regolati gli unghioni (fig. 21) e tosato il pelo.

Poiché per alcuni mesi non avevano avuto la possibilità di uscire dai propri box, alcuni mostravano indolenzimento e indebolimento della muscolatura. Per questo motivo nelle due settimane precedenti lo studio, e per tutta la sua durata, quotidianamente veniva permesso loro di uscire dal box, singolarmente, e di esplorare il capannone per qualche minuto.

Fig. 21. Trimming

Il becco n°3 presentava un ascesso a livello della regione nucale: è stato inciso, lavato (per 4 gg con acqua ossigenata e in seguito con betadine al 10% a giorni alterni) e drenato. All'animale è anche stato somministrato antibiotico per una settimana (Prontocill, 6cc/d) (fig. 22).

Fig. 22. Incisione dell'ascesso

2.1.2 Alimentazione e contatto con il personale

Si è cercato di garantire assunzione e qualità di cibo adeguate tramite somministrazione individuale di fieno e pellet già dalle due settimane precedenti all'effetto femmina. I pellet venivano dati a ogni animale singolarmente, direttamente dalla mano dell'operatore per familiarizzarli al

contatto con l'uomo. Entro pochi giorni tutti i becchi si erano abituati ad assumerlo in questo modo.

2.1.3 Valutazione sanitaria

In ognuno degli otto becchi è stata condotta una valutazione delle condizioni generali. Si è controllato che non avessero difetti di appiombo, patologie o anomalie ai piedi o alla schiena, che non ci fossero alterazioni evidenti dello stato di salute. Alla condizione dell'animale è stato attribuito un punteggio compreso tra 1 (condizione eccellente) e 3 (pessima) e di ognuno è stato stimato il BCS.

In ogni animale sono state indagate le condizioni dello scroto e del suo contenuto, tramite ispezione e palpazione, soprattutto in riferimento alle dimensioni testicolari ed epididimali; sono stati anche valutati pene, glande e prepuzio. Anche a quanto emerso da questo esame è stato attribuito un punteggio compreso tra 1 e 3.

Per la valutazione sonografica di scroto e testicoli è stato utilizzato un ecografo ALOKA 500, con una sonda lineare da 5 MHz. (fig. 23). Le immagini sono state scansionate e valutate per la presenza di anomalie, quali alterazioni della simmetria, della forma, delle dimensioni, presenza di degenerazioni o di aree ipo- o iper- ecogeniche.

Fig. 23. Ecografo ALOKA 500

L'immagine testicolare è stata visualizzata tramite un piano di sezione sagittale, trasversale, longitudinale, secondo il metodo utilizzato da Gouletsou et al. nel 2003.

L'utilizzo dell'ALOKA 500 ha permesso di condurre un'analisi della pixel intensity testicolare. L'acquisizione delle immagini tramite scansione è stata condotta con procedura standardizzata, e i file così ottenuti sono stati sottoposti ad indagine tramite il software IMAGE-J, al fine di determinare l'intensità media dell'area testicolare. Di ogni becco è stata valutata la pixel intensity media nonchè i valori massimi e minimi in una scala di grigi con range 0 (nero) – 255 (bianco). Poiché questo tipo di ecografo non rielabora le informazioni ultrasonografiche rilevate dalla sonda, ma le trasmette al computer tramite una velocità costante di12 bit, è stato possibile valutare i risultati ottenuti senza dover far ricorso a coefficienti di correzione. Il lavoro cui si è fatto principalmente riferimento per tale procedura è quello descritto da Arteaga et al. nel 2005. I valori di pixel intensity per ogni testicolo sono stati sottoposti al test di Pearsono per individuare eventuali correlazioni con gli altri parametri di valutazione andrologica.

2.1.4 Prelievi di sangue

Il sangue raccolto tramite prelievi giugulari (fig. 24) è stato posto in provette da 10ml, sia con EDTA che senza anticoagulante, dipendentemente dalla destinazione. I campioni sono stati centrifugati alla temperatura di 4°C a 1851 giri/min (3000 rpm) per 20 minuti (fig. 25); quindi 2ml di plasma o siero venivano congelati in contenitori in cui fossero indicati data, ora, contenuto e becco di provenienza.

Fig. 24. Prelievo dei campioni ematici

Fig. 25. Separazione del siero dopo centrifugazione

Il plasma e il siero così ottenuti sono stati quindi utilizzati per determinare i valori ematobiochimici, del testosterone e di TSH, T3, T4.

Per valutare la normalità e la stabilità dell'omeostasi metabolica degli animali sono stati effettuati due prelievi ematici: all'inizio e alla fine della settimana di pre-esposizione.

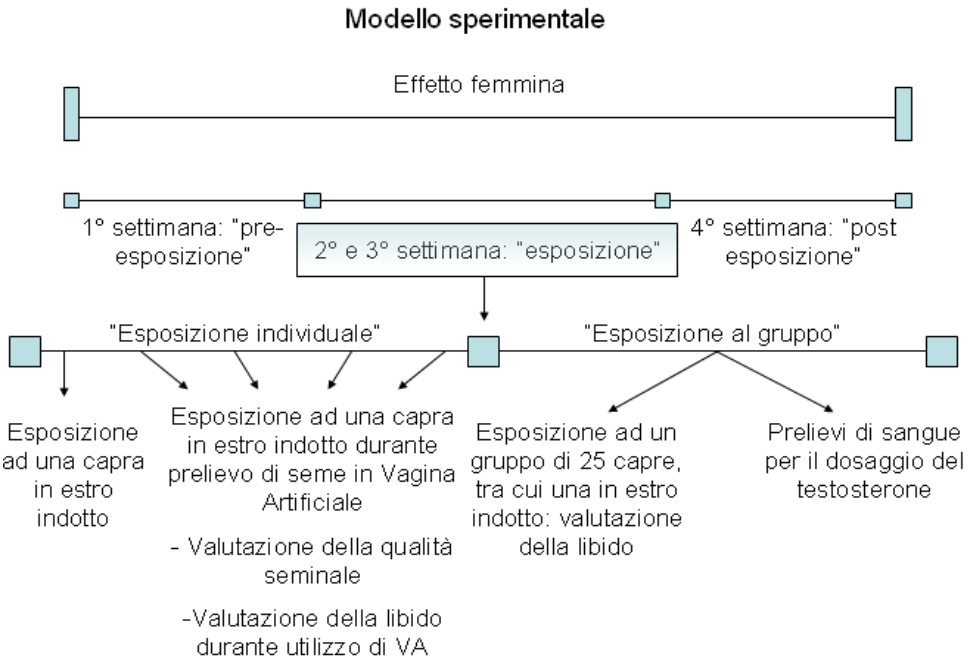
Per valutare l'impatto della ripresa dell'attività sessuale sull'equilibrio metabolico si è effettuato un prelievo ematico da destinare alla determinazione dei livelli sierici di TSH, T3, T4, con l'intenzione di confrontare i valori ottenuti con quelli successivi all'effetto femmina, e quindi effettuati nella settimana post-esposizione.

Alla fine della settimana si è anche effettuato un prelievo per dosare la testosteronemia; a questo scopo tutti i becchi sono stati sottoposti a prelievi seriali a intervalli di due ore, tra le 8.00 e le 17.00.

Le linee guida per la raccolta dei campioni ematici per il dosaggio del testosterone e degli ormoni itroidei impongono di non utilizzare provette EDTA, campioni lipemici o grossolanamente contaminati, campioni emolizzati. Inoltre poiché la centrifugazione dei campioni di siero prima che la coagulazione sia completa può produrre fibrina, causa di risultati errati, ci si è sempre assicurati che il processo di coagulazione fosse completo prima di centrifugare i campioni.

Le provette per il prelievo di sangue appartenevano tutte alla stessa casa produttrice, per evitare di ottenere valori alterati a causa dell'influenza dei materiali e degli additivi usati, inclusi gel e barriere fisiche, attivatori di coaguli e/o anticoagulanti.

2.2 2ª e 3 ª settimana: “esposizione”



2.2.1 Esposizione individuale

La capra utilizzata per il protocollo è stata allontanata dai becchi prima di manifestare segni di estro. Alle 09^{30} del 16 giugno, giorno in cui sono iniziate le manifestazioni estrali, è stata reintrodotta in stalla.

Mentre durante il primo giorno dell’esposizione è stata consentita la monta con penetrazione, nei quattro giorni successivi, nonostante la capra manifestasse segni di estro progressivamente sempre più scarsi, i becchi sono stati sottoposti a raccolta di seme in Vagina Artificiale.

Ai becchi veniva permesso singolarmente di avvicinarsi alla femmina; solo in due occasioni, quando un becco si era dimostrato restio alla monta, si è ricorso alla contemporanea liberazione di un altro maschio perchè la competizione portasse a un miglioramento delle prestazioni.

Per tutta la durata dell’esperimento la capra è stata rinchiusa in un box nella stessa stalla dei becchi, in una posizione da cui potesse essere vista e udita da ognuno di loro.

Nei quattro giorni in cui si è effettuata la raccolta del seme è stato possibile valutarne la qualità e testare la libido dei becchi.

2.2.1.1 Valutazione del seme

Nelle prime due prove è stata stimata solamente la motilità del seme, in tutti gli altri prelievi si è proceduto con l'effettuazione della valutazione completa.

Per prima cosa si è misurato il volume, in ml, di seme ottenuto dall'eiaculato. In seguito è stata valutata la motilità di massa tramite osservazione al microscopio (riscaldato a 37°C) di una goccia di seme tal quale: il punteggio assegnato doveva essere compreso tra 0 e 5. Per mezzo di uno spettrofotometro è stata misurata la concentrazione del seme, espressa in miliardi di spermatozoi/ml. Nei prelievi in cui la concentrazione era maggiore del requisito minimo di $3x10^9$ spermatozoi/ml il seme è stato diluito con diluitore a base di latte scremato, mantenuto alla temperatura di 37°C, fino ad ottenere una concentrazione di 1,6 miliardi di spermatozoi/ml; a questo punto era possibile assegnare un punteggio alla motilità progressiva (0-5) e alla vitalità (0-100%). Il seme infine veniva refrigerato a 15°C e gli veniva assegnato un ulteriore punteggio di motilità (0-5) e vitalità (0-100%).

2.2.1.2 Osservazione del comportamento durante l'utilizzo della Vagina Artificiale

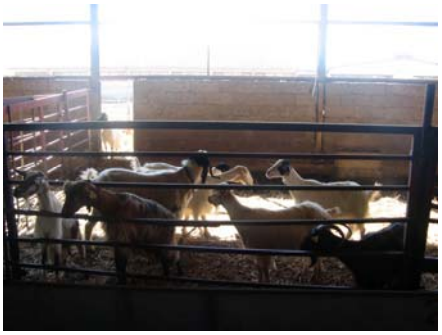
A ogni becco veniva presentata la capra in estro, all'interno della stalla e in una posizione tale per cui gli altri becchi potessero vedere i tentativi precedenti il proprio. Veniva registrato il tempo di avvicinamento alla capra, la latenza del primo salto e del primo eiaculato.

2.2.2 Esposizione al gruppo

Durante questa settimana ogni becco è stato sottoposto singolarmente a una prova di libido durante la quale veniva inserito in un recinto con 25 capre; tra le quali ne era sempre presente una in estro indotto (fig. 26). Inizialmente si è tentato di registrare tutti i comportamenti tipici del corteggiamento, ma la soggettività delle osservazioni ha fatto preferire una versione semplificata ma più affidabile, cioè la semplice numerazione

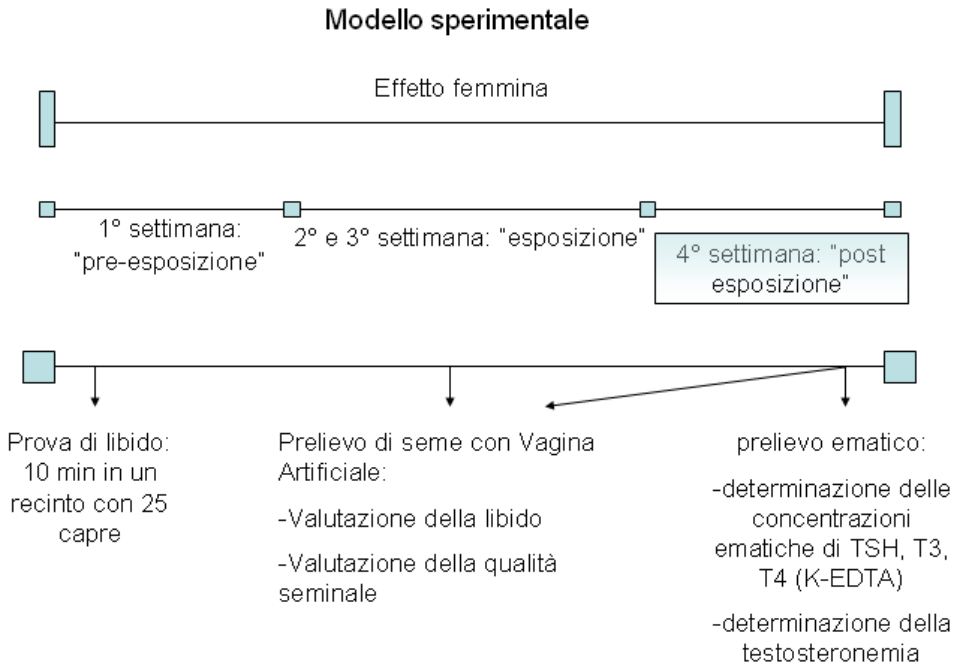
delle monte e degli eiaculati, con i relativi tempi di latenza, che si verificavano nell'arco di 30 minuti.

Fig. 26. Test di libido in recinto: esposizione al gruppo.



Il giorno stesso il becco veniva sottoposto a prelievi ematici seriali, per la determinazione della testosteronemia, effettuati con le stesse modalità utilizzate nella settimana di pre-esposizione.

2.3 4ª settimana: "post - esposizione"



In questa settimana, che dovrebbe essere considerata rappresentativa della stagione riproduttiva, la libido è stata testata, sia in recinto sia durante il prelievo di seme, seguendo le stesse modalità utilizzate nel periodo di esposizione, con l'unica differenza che il tempo a disposizione dei becchi per la prova con le 25 capre è stato ridotto a 10 minuti.

Il test sul comportamento riproduttivo durante l'utilizzo della vagina artificiale è stato ripetuto due volte, a metà e a fine settimana, e in entrambe è stato possibile valutare la qualità seminale.

Al termine della settimana post–esposizione sono stati ripetuti, ricalcando le modalità utilizzate nelle settimane precedenti, i prelievi per la determinazione del testosterone, del TSH, del T3 e del T4 ematici.

2.4 Metodo laboratoristico impiegato per il dosaggio della testosteronemia

In questo studio le concentrazioni ematiche di testosterone sono state determinate tramite l'utilizzo del test di laboratorio "testosterone totale IMMUNOLITE 1000®" ad uso diagnostico *in vitro* per la misurazione quantitativa del testosterone nel siero e nel plasma eparinizzato.

IMMUNOLITE 1000 Testosterone Totale® è un enzima di fase solida, chimico luminescente, sfruttato per effettuare immuno-analisi.

L'Immulite è composto da diversi sottosistemi completamente integrati inclusi una piattaforma di carico, un carosello per i reagenti, un carosello di incubazione, una stazione di lavaggio rotante, un luminometro e un computer esterno.

Il dosaggio immunologico sull'Immulite impiega un tracciante chemiluminescente amplificato dall'enzima.

La fosfatasi alcalina viene coniugata all'anticorpo specifico per l'analita per realizzare un dosaggio immunometrico in eccesso di anticorpo o all'analita biotinilato per il dosaggio competitivo con un limitato numero di anticorpi.

Il substrato chemiluminescente della fosfatasi alcalina è l'1,2-dioxetano, che viene destabilizzato dalla fosfatasi alcalina determinando la produzione di un composto intermedio anionico eccitato.

Il dioxetano intermedio instabile emetterà la luce nel ritornare al suo stato fondamentale. La provetta per il dosaggio sull'Immulite contiene una sferetta in polistirene che costituisce la fase solida per l'anticorpo specifico dell'analita, e serve come sito di reazione per l'incubazione, il lavaggio e lo sviluppo del segnale. La provetta brevettata per il dosaggio

Immulite permette una rotazione ad elevata velocità lungo l'asse longitudinale per separare le componenti della reazione.

La conta dei fotoni viene convertita in concentrazione dell'analita per mezzo di un computer esterno.

Il volume richiesto per ogni provetta è 20mcl di siero. Il porta campioni deve contenere almeno 100mcl più del volume totale richiesto.

2.4.1 Limiti del test

Gli anticorpi eterofili presenti nel siero possono reagire con le immunoglobuline presenti nelle componenti del dosaggio provocando un'interferenza con i dosaggi in vitro. I reagenti forniti sono stati formulati per minimizzare il rischio di interferenze, tuttavia possono verificarsi interazioni potenziali tra sieri rari e componenti del test.

2.4.2 Prestazioni del test

- Fattore di conversione: ng/dL * 0,03467 = nmol/L;
- Range di calibrazione: 20 – 1600ng/dL (0,7 – 55nmol/L);
- Sensibilità analitica: 15ng/dL (0,5 nmol/L);
- Precisione: i campioni sono stati elaborati da 20 giorni, due esercitazioni al giorno, per un totale di 20 esecuzioni e 80 ripetizioni;
- Linearità: i campioni sono stati provati sotto varie diluizioni;
- Recupero: sono stai dosati campioni ai quali sono state aggiunte tre soluzioni di testosterone (2000, 6000 e 12000 ng/dL) 1:19
- Specificità: l'anticorpo è molto specifico per il testosterone;
- Bilirubina: la presenza a concentrazioni fino a 100mg/l non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio;
- Emolisi: la presenza in concentrazioni fino a 300mg/dL non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio;
- Lipemia: la presenza di trigliceridi in concentrazione superiore a 1000mg/dL potrebbe interferire con la prova. In caso di campioni lipemici si consiglia di effettuare centrifugazione del campione.

2.5 Esame ematobiochimico

La determinazione delle concentrazioni dei differenti parametri è stata ottenuta tramite l'utilizzo del sistema Hitachi 912®.

Hitachi 912 è un sistema analitico altamente sensibile applicabile a campioni di siero, plasma (utilizzati nel corso dell'esperimento), urina ed emolisati per la determinazione delle concentrazioni di diversi enzimi, substrati, elettroliti, proteine specifiche e droghe.

Il suo utilizzo all'interno del modello sperimentale era rivolto alla determinazione delle concentrazioni ematiche di glucosio, trigliceridi, colesterolo, albumina, globuline, proteine totali, urea, AST, GGT, CK, bilirubina (diretta, indiretta e totale), Ca, Mg e P.

2.6 Determinazione delle concentrazioni ematiche di TSH, T3, T4

La determinazione delle concentrazioni ematiche è stata ottenuta tramite l'utilizzo del sistema Immulite 1000®. Si tratta di un metodo per la determinazione *in vivo* dei valori sierici di TSH, T3 e T4.

Il principio della procedura è sovrapponibile a quello per la determinazione della testosteronemia (pur differenziandosi ovviamente per il tipo di reagente impiegato), e così pure le indicazioni per la gestione dei campioni ematici.

Il volume di siero richiesto per ogni provetta è 30μl per la determinazione del T4 e 25μl per quella di TSH e T3. Il porta campioni deve contenere almeno 100mcl più del volume totale richiesto.

Prestazioni del test per la determinazione di T3:

- Fattore di conversione: ng/dL * 0,01536 = nmol/L.
- Range di calibrazione: 40 – 600ng/dL (0,61-9,2nmol/L).
- Sensibilità analitica: 35ng/dL (0,54 nmol/L).
- Linearità: i campioni sono stati provati sotto varie diluizioni.
- Recupero: sono stai dosati campioni ai quali sono state aggiunte tre soluzioni di T3 (1,395, 2,576 e 3,318 ng/dL) 1:19.
- Specificità: l'anticorpo è molto specifico per T3.

- Bilirubina: la presenza a concentrazioni fino a 200mg/l non ha nessun effetto sui risultati entro il range di precisione del dosaggio.
- Emolisi: la presenza di emolisi massiva ha effetto sul dosaggio causandone una sottostima di circa il 10-20%.
- Lipemia: la presenza di trigliceridi in concentrazione inferiore a 3000mg/dL non interferisce con la prova.

Prestazioni del test per la determinazione del TSH:

- Range di calibrazione: fino a 12ng/mL (0,61-9,2nmol/L).
- Sensibilità analitica: 0,01ng/mL (0,54 nmol/L).
- Linearità: i campioni sono stati provati sotto varie diluizioni.
- Recupero: sono stai dosati campioni ai quali sono state aggiunte tre soluzioni di TSH (4,3, 8,5 e 18 ng/mL) 1:19.
- Specificità: l'anticorpo è molto specifico per il TSH canino.
- Emolisi: non ha effetti sulla precisione del dosaggio.
- Lipemia: la presenza di trigliceridi in concentrazione inferiore a 5000mg/dL non interferisce con la prova.

Prestazioni del test per la determinazione di T4:

- Fattore di conversione: ng/dL * 12,87 = nmol/L.
- Range di calibrazione: 0,5-15mcg/dL (6,4-193nmol/L).
- Sensibilità analitica: 0,12mcg/dL (0,54 nmol/L).
- Linearità: i campioni sono stati provati sotto varie diluizioni.
- Recupero: sono stai dosati campioni ai quali sono state aggiunte tre soluzioni di T4 (17, 32 e 62 mcg/dL) 1:19.
- Specificità: l'anticorpo è molto specifico per il T4 canino.

2.7 Preparazione del medium diluitore

Di seguito viene descritta la procedura per la preparazione del mestruo diluitore utilizzato per il seme caprino.

- Far bollire 200 ml di H2O mQ sterile con disciolti 0,388 gr di glucosio (destrogiro);
- Raffreddare e solubilizzare (con un agitatore magnetico) 20 gr di latte in polvere nell'acqua glucosata;
- Riscaldare a 90°C per 10 min in un bagnetto agitato a 200 rpm;
- Raffreddare a meno di 40°C;
- Aggiungere e solubilizzare con un agitatore magnetico penicillina G 100.000 U/ml (124,22 mg) e streptomicina 0,1 gr/100ml (0,2 gr).

2.8 Analisi dei dati

I dati ottenuti sono stati analizzati tramite ANOVA utilizzando la procedura GLM del software SIGMASTAT 2.03.

I parametri relativi al profilo metabolico (GLU: glucosio; TG: trigliceridi; COL: colesterolo; ALB: albumina; GLO: globulina; PT: proteine totali; UREA: urea plasmatica; AST: aspartato-amino-transferasi; CK: creatin-chinasi; GGT: gamma-glutamin-transferasi; BILI: bilirubina indiretta; BILD: bilirubina diretta; BILT: bilirubina totale; Ca: calcio; Mg: magnesio; P: fosforo), al profilo tiroideo (TSH: tireotropina; T3: 3-3'-5-triiodotironina; T4: tiroxina), quelli seminali (Mot Sf: motilità del seme fresco; Vol Sf: volume del seme fresco; Conc Sf: concentrazione del seme fresco; Mot Sd: motilità del seme diluito; Vit Sd: vitalità del seme diluito; Mot Sr: motilità del seme refrigerato; Vit Sr: vitalità del seme refrigerato) e comportamentali (tAvvPM: tempo di avvicinamento alla capra in estro nelle prove di libido in recinto; tAvvVA: tempo di avvicinamento alla capra nelle prove di libido con l'utilizzo della vagina artificiale; SaltoPM:; tempo di latenza del primo tentativo di monta nelle prove di libido in recinto; SaltoVA: tempo di latenza del primo tentativo di monta nelle prove di libido durante l'utilizzo della vagina artificiale; EiacPM:; tempo di latenza

del primo eiaculato nelle prove di libido in recinto; EiacVA: tempo di latenza del primo eiaculato nelle prove di libido durante l'utilizzo della vagina artificiale) sono stati analizzati considerando come variabile indipendente il periodo(pre-esppsizione, esposizione, post-esposizione).

L'analisi della varianza del profilo testosteronemico ha preso in considerazione come variabili indipendenti il periodo (pre-esposizione; esposizione; post-esposizione) e il prelievo (8^{00} - 10^{00} - 12^{00} - 14^{00} – 16^{00}). Le comparazioni sono state valutate tramite il test di Tuckey con $P<0,05$.

Inoltre sono stati calcolati gli indici di correlazione di Pearson per valutare se vi fossero risultati significativi ($P<0,05$).

Parametri confrontati nella ricerca di correlazioni:

- TSH1: valore medio di TSH nella settimana di pre-esposizione;
- TSH2: valore medio di TSH nella settimana di post-esposizione;
- ΔTSH: variazione nelle concentrazioni di TSH tra settimana pre-esposizione e post-esposizione;
- T3-1: valore medio di T3 nella settimana di pre-esposizione;
- T3-2: valore medio di T3 nella settimana di post-esposizione;
- ΔT3: variazione nelle concentrazioni di T3 tra settimana pre-esposizione e post-esposizione;
- T4-1: valore medio di T4 nella settimana di pre-esposizione;
- T4-2: valore medio di T4 nella settimana di post-esposizione;
- ΔT4: variazione nelle concentrazioni di T4 tra settimana pre-esposizione e post-esposizione;
- Test 1: valore medio della testosteronemia nella settimana di pre-esposizione;
- Test 2: valore medio della testosteronemia nel periodo di esposizione;
- Test 3: valore medio della testosteronemia nella settimana di post-esposizione;
- ΔTest 1: variazione nelle concentrazioni di testosterone tra settimana pre-esposizione e periodo di esposizione;
- ΔTest 2: variazione nelle concentrazioni di testosterone tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- ΔTest 3: variazione nelle concentrazioni di testosterone tra settimana pre-esposizione e settimana post-esposizione;
- GLU1: valore medio di concentrazione ematica di glucosio a inizio della settimana di pre-esposizione;
- GLU2: valore medio di concentrazione ematica di glucosio alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔGLU: variazione nelle concentrazioni di glucosio tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- TG1: valore medio di concentrazione ematica di trigliceridi a inizio della settimana di pre-esposizione;
- TG2: valore medio di concentrazione ematica di trigliceridi alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔTG: variazione nelle concentrazioni di trigliceridi tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- COL1: valore medio di concentrazione ematica di colesterolo a inizio della settimana di pre-esposizione;
- COL2: valore medio di concentrazione ematica di colesterolo alla fine della settimana di pre-esposizione;

- ΔCOL: variazione nelle concentrazioni di colesterolo tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- ALB1: valore medio di concentrazione ematica di albumina a inizio della settimana di pre-esposizione;
- ALB2: valore medio di concentrazione ematica di albumina alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔALB: variazione nelle concentrazioni di albumina tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- GLO1: valore medio di concentrazione ematica delle globuline a inizio della settimana di pre-esposizione;
- GLO2: valore medio di concentrazione ematica delle globuline alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔGLO: variazione nelle concentrazioni delle globuline tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- PT1: valore medio di concentrazione ematica di proteine totali a inizio della settimana di pre-esposizione;
- PT2: valore medio di concentrazione ematica di proteine totali alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔPT: variazione nelle concentrazioni di proteine totali tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- UREA1: valore medio di concentrazione ematica di urea a inizio della settimana di pre-esposizione;
- UREA2: valore medio di concentrazione ematica alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔUREA: variazione nelle concentrazioni di urea tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- AST1: valore medio di concentrazione ematica di aspartato-amino-transferasi a inizio della settimana di pre-esposizione;
- AST2: valore medio di concentrazione ematica di aspartato-amino-transferasi alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔAST: variazione nelle concentrazioni di aspartato-amino-transferasi tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- CK1: valore medio di concentrazione ematica di creatin-chinasi a inizio della settimana di pre-esposizione;
- CK2: valore medio di concentrazione ematica di creatin-chinasi alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔCK: variazione nelle concentrazioni di creatin-chinasi tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- GGT1: valore medio di concentrazione ematica di gamma-glutamin-transferasi a inizio della settimana di pre-esposizione;
- GGT2: valore medio di concentrazione ematica di gamma-glutamin-transferasi alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔGGT: variazione nelle concentrazioni di gamma-glutamin-transferasi tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- BILI 1: valore medio di concentrazione ematica di bilirubina indiretta a inizio della settimana di pre-esposizione;
- BILI 2: valore medio di concentrazione ematica di bilirubina indiretta alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔBILI: variazione nelle concentrazioni di bilirubina indiretta tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- BILD 1: valore medio di concentrazione ematica di bilirubina diretta a inizio della settimana di pre-esposizione;

- BILD 2: valore medio di concentrazione ematica di bilirubina diretta alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔBILD: variazione nelle concentrazioni di bilirubina diretta tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- BILT 1: valore medio di concentrazione ematica di bilirubina totale a inizio della settimana di pre-esposizione;
- BILT 2: valore medio di concentrazione ematica di bilirubina totale alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔBILT: variazione nelle concentrazioni di bilirubina totale tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- Ca 1: valore medio di concentrazione ematica di calcio a inizio della settimana di pre-esposizione;
- Ca 2: valore medio di concentrazione ematica di calcio alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔCa: variazione nelle concentrazioni di calcio tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- Mg 1: valore medio di concentrazione ematica di magnesio a inizio della settimana di pre-esposizione;
- Mg 2: valore medio di concentrazione ematica di magnesio alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔMg: variazione nelle concentrazioni di magnesio tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- P 1: valore medio di concentrazione ematica di fosforo a inizio della settimana di pre-esposizione;
- P 2: valore medio di concentrazione ematica di fosforo alla fine della settimana di pre-esposizione;
- ΔP: variazione nelle concentrazioni di fosforo tra inizio e fine della settimana pre-esposizione;
- Mot Sf 1: punteggio medio di motilità del seme fresco nel periodo di esposizione;
- Mot Sf 2: punteggio medio di motilità del seme fresco nella settimana di post-esposizione;
- ΔMot Sf: variazione nel punteggio medio di motilità del seme fresco tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- Mot Sd 1: punteggio medio di motilità del seme diluito nel periodo di esposizione;
- Mot Sd 2: punteggio medio di motilità del seme diluito nella settimana di post-esposizione;
- ΔMot Sd: variazione nel punteggio medio di motilità del seme diluito tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- Mot Sr 1: punteggio medio di motilità del seme refrigerato nel periodo di esposizione;
- Mot Sr 2: punteggio medio di motilità del seme refrigerato nella settimana di post-esposizione;
- ΔMot Sr: variazione nel punteggio medio di motilità del seme refrigerato tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- Vol Sf 1: volume medio del seme fresco nel periodo di esposizione;
- Vol Sf 2: volume medio del seme fresco nella settimana di post-esposizione;
- ΔVol Sf: variazione nel volume medio di seme fresco tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- Conc Sf 1: concentrazione media del seme fresco nel periodo di esposizione;
- Conc Sf 2: concentrazione media del seme fresco nella settimana di post-esposizione;
- ΔConc Sf: variazione nella concentrazione media del seme fresco tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- Vit Sd 1: punteggio medio di vitalità del seme diluito nel periodo di esposizione;
- Vit Sd 2: punteggio medio di vitalità del seme diluito nella settimana di post-esposizione;
- ΔVit Sd: variazione nel punteggio medio di vitalità del seme diluito tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione;
- Vit Sr 1: punteggio medio di vitalità del seme refrigerato nel periodo di esposizione;
- Vit Sr 2: punteggio medio di vitalità del seme refrigerato nella settimana di post-esposizione;

- ΔVit Sr: variazione nel punteggio medio di vitalità del seme refrigerato tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione
- t avv PM: tempo medio di avvicinamento nel test di libido in recinto;
- t avv VA: tempo medio di avvicinamento durante l'utilizzo di vagina artificiale;
- Salto PM1: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo tentativo di monta durante il test di libido in recinto nel periodo di esposizione;
- Salto PM2: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo tentativo di monta durante il test di libido in recinto nel periodo di post-esposizione;
- ΔSalto PM: variazione nel tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo tentativo di monta nel test di libido in recinto tra periodo di esposizione e settimana di post-esposizione;
- Salto VA1: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo tentativo di monta durante l'utilizzo della vagina artificiale nel periodo di esposizione;
- Salto VA2: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo tentativo di monta durante l'utilizzo della vagina artificiale nel periodo di post-esposizione;
- ΔSalto VA: variazione nel tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo tentativo di monta durante l'utilizzo della vagina artificiale tra periodo di esposizione e settimana di post-esposizione;
- Eiac. PM1: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo eiaculato durante il test di libido in recinto nel periodo di esposizione;
- Eiac. PM2: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo eiaculato durante il test di libido in recinto nel periodo di post-esposizione;
- ΔEiac. PM: variazione nel tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo eiaculato nel test di test di libido in recinto tra periodo di esposizione e settimana di post-esposizione;
- Eiac. VA1: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo eiaculato durante l'utilizzo della vagina artificiale nel periodo di esposizione;
- Eiac. VA2: tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo eiaculato durante l'utilizzo della vagina artificiale nel periodo di post-esposizione;
- ΔEiac. VA: variazione nel tempo medio richiesto per l'effettuazione del primo eiaculato durante l'utilizzo della vagina artificiale tra periodo di esposizione e settimana di post-esposizione.

3 RISULTATI

3.1 Esame clinico

In 6 becchi lo stato fisico generale è stato ritenuto buono (punteggio 1,25 – 1,5; becchi n° 7 - 8) o molto buono (punteggio 1; becchi n° 1 - 2 - 4 - 6); ciò significa che non sono state riscontrate anomalie rilevanti in termini di costituzione, sviluppo scheletrico (soprattutto per quanto riguarda gli appiombi), stato nutrizionale, e nemmeno segni di possibili patologie con coinvolgimento sistemico.

I BCS assegnati oscillavano tra 2,75 e 3, 25.

Nel becco n° 5 la lunga permanenza in un box relativamente piccolo aveva provocato debolezza muscolare agli arti pelvici, per cui all'inizio della settimana di pre-esposizione manifestava andatura goffa e incerta (fig. 27). È stato sufficiente garantirgli del movimento fisico per qualche giorno per portarlo a riacquisire una deambulazione quasi normale (l'andatura ha continuato ad essere quasi impercettibilmente incerta). Il punteggio attribuitogli è stato di 1,75.

Fig. 27. Stazione e deambulazione anomale in un becco causati da debolezza muscolare

Il becco n°3 presentava un ascesso di 15 cm di diametro nella regione nucale (fig. 28); non dava però altri segni di malessere. Il punteggio complessivo riassumente la condizione fisica assegnatogli è stato 2,25.

Fig. 28. Ascesso nella regione nucale di uno dei becchi utilizzati nell'esperimento

Quattro mesi dopo il termine dell'esperimento lo stesso becco è stato ritrovato morto nel box; all'esame anatomo-patologico sono stati riscontrati ascessi disseminati in tutto l'organismo. La causa del decesso è stata ipotizzata essere proprio un ascesso che si era esteso in profondità fino ad arrivare a coinvolgere il midollo spinale a livello cervicale.

7 becchi su 8 sono stati valutati essere in condizioni soddisfacenti per quanto riguarda lo stato dell'apparato riproduttore. A tutti è stato attribuito un punteggio di 1.

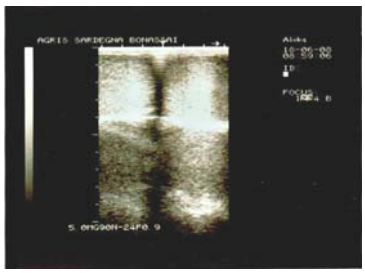
Il becco n° 3 presentava uno scroto abnormemente aumentato di volume. Alla palpazione la coda dell'epididimo destro era dilatata. La testa dell'epididimo sinistro era aumentata di volume tanto da risultare più grossa del testicolo stesso, di consistenza morbida. Il testicolo sinistro stesso era aumentato di volume. Il punteggio attribuito a questo soggetto è stato di 2,75.

Al termine del periodo di esposizione in tutti i becchi l'esame clinico ha permesso di verificare l'avvenuta ripresa di secrezione delle ghiandole sebacee che in stagione riproduttiva determinano il tipico odore pungente.

3.2 Esami strumentali

In 4 becchi (n° 1 - 2 - 5 - 7) l'ecografia testicolare (fig. 29) non ha riscontrato anomalie.

Fig. 29. Aspetto fisiologico dell'ecografia testicolare



In due becchi (n° 4 e 6) sono state riscontrate delle piccole zone tondeggianti ecoriflettenti; in numero molto ridotto e con coinvolgimento di un solo testicolo nel n° 4, con numerosità esigua ma con diffusione maggiore nel n° 6. Poiché tali lesioni non erano rilevabili alla palpazione, al fine di valutare l'attendibilità della visualizzazione ecografica, si è deciso di confrontare le immagini con ciò che è emerso dall'esame ispettivo anatomopatologico (fig. 30).

Fig. 32. Contenuto scrotale del becco n° 6: aspetto anatomopatologico (1 e 2) ed ecografico (3)

1.

2.

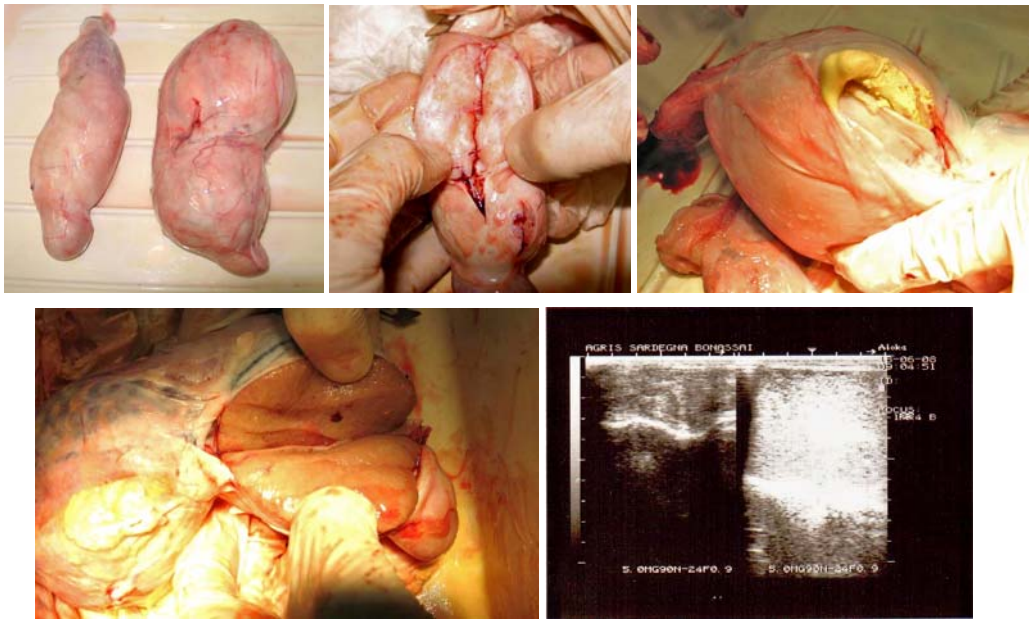
3.

Nel becco n° 8 sono state visualizzate delle aree iperecogene in entrambi i testicoli, questa volta però non tondeggianti, bensì allungate; il mediastino si presentava ispessito.

Nel becco n° 3 infine l'utilizzo dell'ecografia ha aiutato a delineare una diagnosi eziologica che giustificasse l'aspetto anomalo dell'apparato riproduttore. All'esame ecografico dello scroto si poteva visualizzare una dilatazione abnorme della testa dell'epididimo sinistro, con perdita del normale aspetto ecografico perchè totalmente ipoecogeno e alterato nella forma; il testicolo sinistro era aumentato di volume ma con ecotessitura normale; a destra il testicolo aveva forma ed ecogenicità totalmente alterati e la coda dell'epididimo destro era dilatata.

La contemporanea valutazione dei rilievi ispettivi, di palpazione ed ecografici, oltre alla considerazione che l'animale in questione fosse vasectomizzato, avevano portato a formulare diagnosi di granuloma spermatico, poi confermata dall'esame anatomopatologico condotto alla morte dell'animale (fig. 31).

Fig. 31. Contenuto scrotale del becco n° 3: aspetto anatomopatologico ed ecografico.



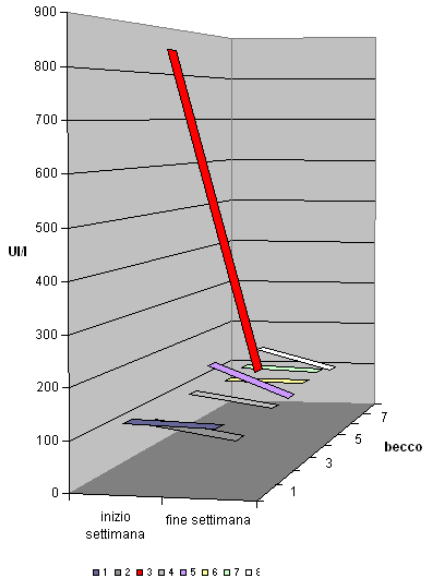
L'analisi della pixel intensity testicolare ha evidenziato un valore medio di 230,57, da cui nessun animale si è discostato significativamente se non il becco n° 3 il cui testicolo sinistro aveva intensità ecografica pari a 149,94. Dal test di Pearson emerge che la pixel intensity del testicolo sinistro è correlata positivamente con la testosteronemia del periodo di esposizione, con il Δtest.1, con il ΔTSH e con il ΔsaltoPm e negativamente con saltoPm1, EOP, TSH1.

I valori medi dell'esame ematobiochimico, a inizio e fine della settimana di pre-esposizione, sono riportati nella tabella 4 .

La sottoposizione di questi dati al test di Pearson non ha lasciato emergere differenze significative tra le concentrazioni di inizio e di fine della settimana di pre-esposizione (tabella 4). L'unico parametro che abbia fatto eccezione è stato il glucosio: la glicemia media è diminuita in modo significativo nel corso di questo intervallo di tempo. Poiché il valore

assoluto della CK era diminuito notevolmente tra le due misurazioni, sebbene in modo non significativo, si è deciso di valutare i dati dei singoli animali (fig. 32).

Fig. 32. Concentrazioni ematiche medie di CK a inizio e fine della settimana pre-esposizione.



Sono di seguito riportate le correlazioni tra i valori medi dell'esame ematobiochimico e TSH, T3 e T4. (tabella 9) e tra gli stessi valori e il testosterone (tabella 10).

Nel monitoraggio della testosteronemia sono stati presi in considerazione: i valori medi nei tre diversi intervalli dell'esperimento (pre-esposizione, esposizione e post-esposizione), sia come gruppo (fig. 33) sia individualmente (fig. 34); i valori medi nei diversi periodi e nei diversi orari (tabella 8); le correlazioni tra testosterone (in periodo di pre-esposizione, di esposizione e di post-esposizione) e TSH, T3, T4. (tabella 11).

Fig. 33. Valori medi di testosterone dell'intero gruppo di animali nella settimana di pre-esposizione, nel periodo di esposizione e nella settimana post-esposizione.

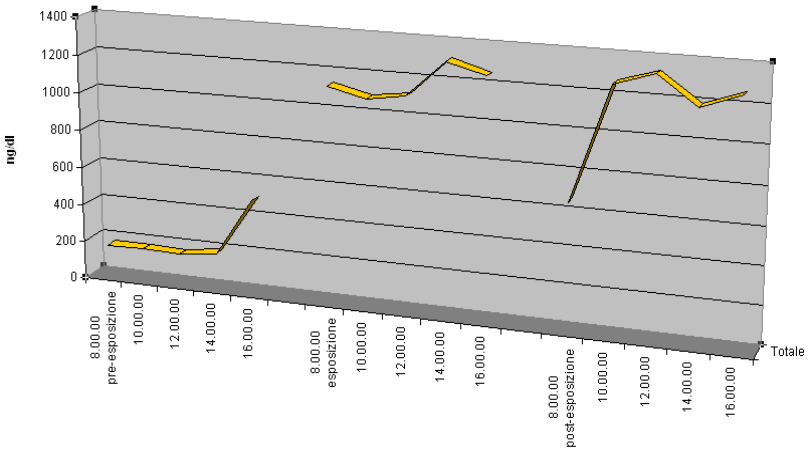
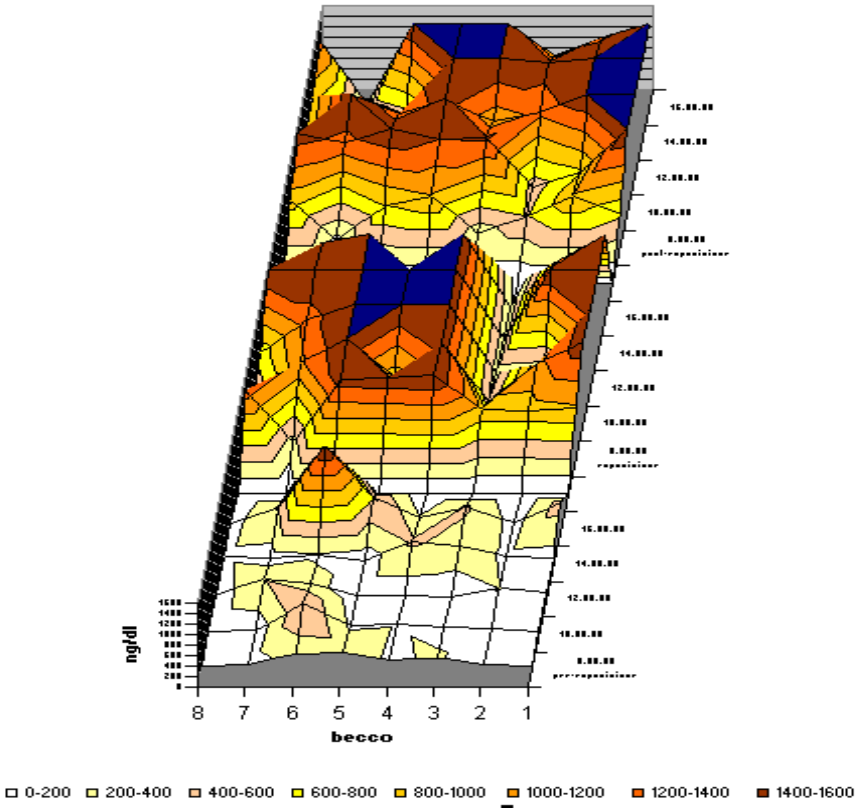


Fig. 34. Andamento della testosteronemia nei singoli animali, in rapporto alle diverse ore e nei tre differenti periodi.



Per meglio interpretare l'efficacia individuale dell'effetto femmina sono stati presi in considerazione anche i livelli medi di testosterone nei tre differenti periodi nei singoli animali (fig. 35) e alle diverse ore nei medesimi periodi (fig. 36).

Fig. 35. Testosteronemia media dei singoli animali in periodo di pre-esposizione, di esposizione e post-esposizione

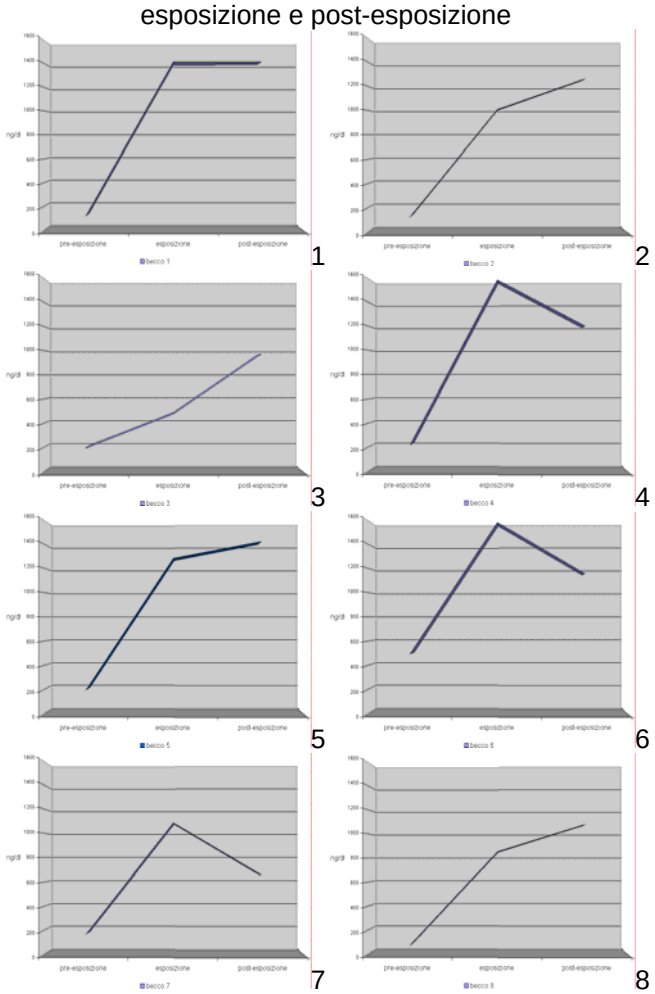
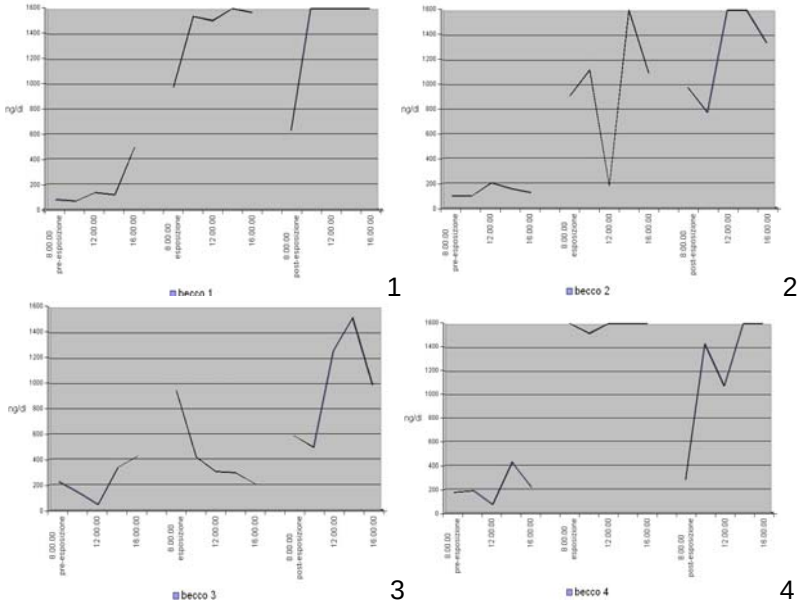
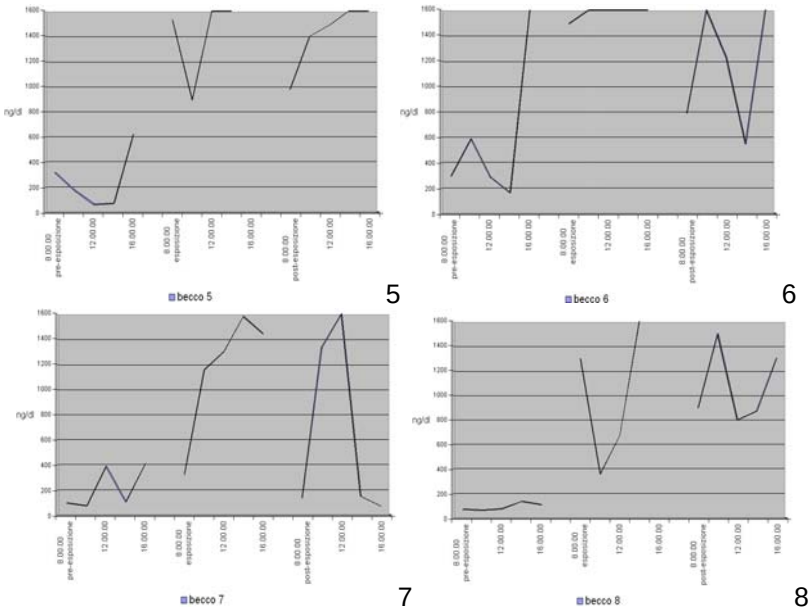


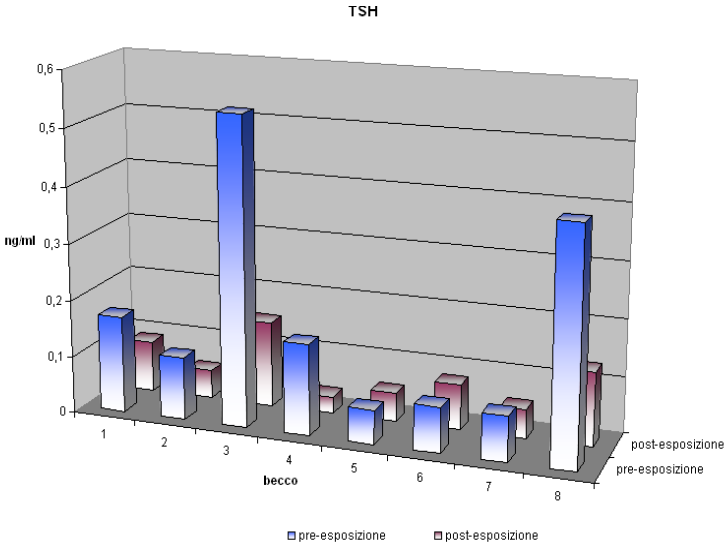
Fig. 36. Livelli medi di testosterone dei singoli becchi ai differenti orari di prelievo e nei tre periodi di esperimento.

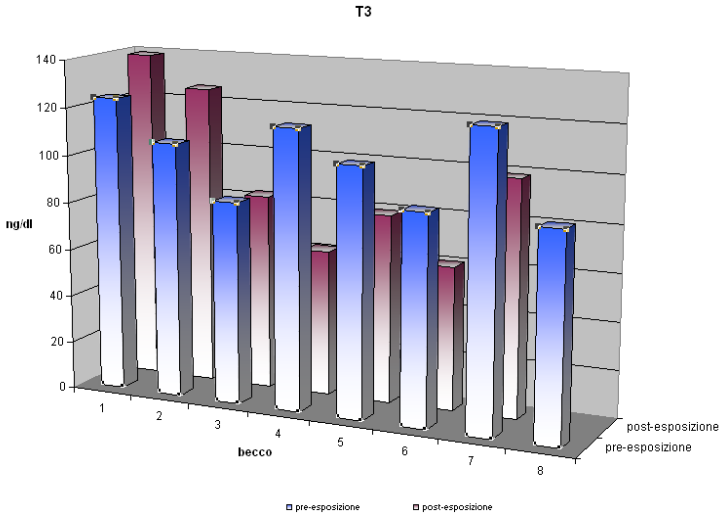


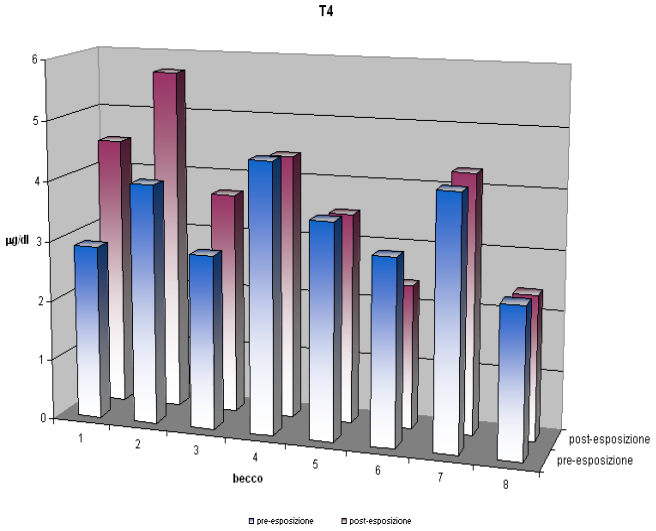


Sono stati infine messi a confronto i valori medi di TSH, T3 e T4 della settimana di pre-esposizione e di quella post-esposizione alla ricerca di differenze statisticamente significative (fig. 37; tabella 5).

Fig. 37. Valori medi individuali di TSH, T3, T4 nelle settimane di pre-esposizione e di post-esposizione.







3.3 Qualità del seme

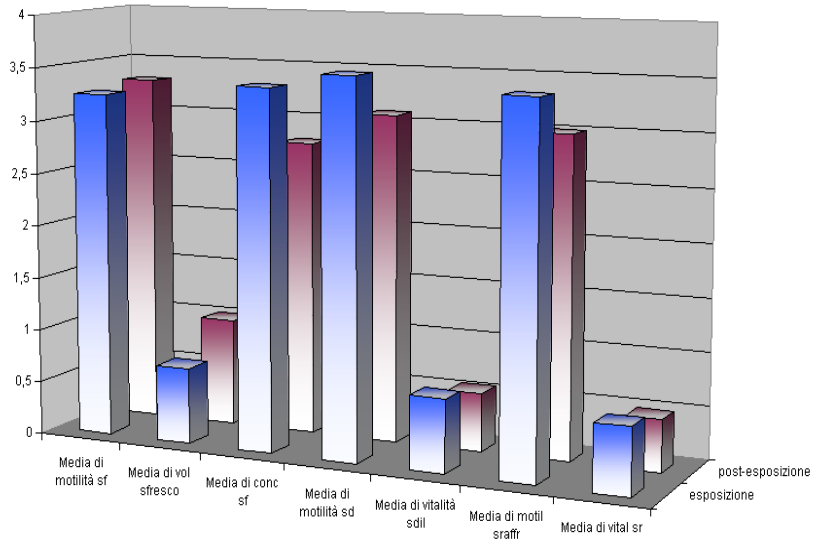
Nel becco 1 e 3 non è stato possibile valutarla perchè vasectomizzati.

Nella settimana di esposizione individuale non tutti gli animali hanno reagito pienamente alla stimolazione della femmina; progressivamente si è riusciti ad effettuare il prelievo tramite vagina artificiale a un numero crescente di becchi, riuscendo ad analizzare il seme della totalità degli animali solo l'ultimo giorno.

Nella valutazione dei parametri indicativi della qualità seminale si è assistito al miglioramento (non significativo), nel passaggio tra periodo di transizione e stagione riproduttiva, solamente di volume e concentrazione medi del seme fresco. Tutti i rimanenti parametri (motilità media del seme

fresco, motilità e vitalità medie del seme diluito e motilità e vitalità medie del seme refrigerato) sono peggiorati in quest'intervallo di tempo (fig 38).

Fig. 38. Modificazioni dei parametri seminali tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione.



Le differenze tra i due periodi di valutazione si sono dimostrate significative da un punto di vista statistico solo nel seme diluito e refrigerato (tabella 6).

3.4 Valutazione della libido

Per l'interpretazione dei risultati ottenuti durante le prove di libido in recinto e durante l'utilizzo della vagina artificiale si sono cercate le correlazioni esistenti tra i punteggi e i valori ematici di testosterone, TSH, T3, T4 (tabella 12).

I valori medi emersi nelle valutazioni della libido sono riassunti nella tabella numero 7.

Tabella 4. Valori dei parametri ematobiochimici (media ± errore standard) all'inizio e alla fine della settimana di pre-esposizione.

	Inizio settimana pre-esposizione	Fine settimana pre-esposizione
GLU (mmol/l)	3.35±0.11*	3±0.07**
TG (mmol/l)	0,22±0,03	0,18±0,03
COL (mmol/l)	0,98±0,06	0,88±0,08
ALB (g/l)	34,63±0,96	35,88±1,09
GLO (g/l)	46,75±1,67	46,63±1,46
PT (g/l)	81,38±1,45	82,50±1,07
UREA (mmol/l)	11.26±0.67	8.84±0.94
AST (UI/l)	65,75±3,74	58,88±2,64
CK (UI/l)	215,00±90,10	110,63±12,20
GGT (UI/l)	50,25±2,84	45,00±2,01
BILD (μmol/l)	1,31±0,11	1,60±0,33
BILI (μmol/l)	6,09±0,37	6,37±0,25
BILT (μmol/l)	7,28±0,35	7,98±0,28
Ca (mmol/l)	2,34±0,09	2,32±0,08
Mg (mmol/l)	1,01±0,02	1±0,04
P (mmol/l)	2,46±0,19	2,33±0,20

La presenza di un diverso numero di asterischi indica l'esistenza di una diversità statistica significativa.

Tabella 5. Livelli di TSH, T3, T4 (media ± e. s.) nella settimana di pre-esposizione e in quella di post-esposizione.

Ormoni metabolici	TSH (ng/ml)	T3 (ng/dl)	T4 (μg/dl)	T3/T4
Settimana di pre-esposizione	0,20 ± 0,06	104,20 ± 5,82	3,46 ± 0,25	0,030
Settimana post-esposizione	0,08 ± 0,02	92,39 ± 11,56	3,86 ± 0,39	0,024

La presenza di lettere differenti indica esistenza di significatività statistica.

Tabella 6. Valori dei parametri di valutazione della qualità del seme (media ± e.s.).

	CONC SF (10^9spermatozoi/ml)	MOT SF (1-5)	VOL SF (ml)	MOT SD (1-5)	VIT SD (0-1)	MOT SR (1-5)	VIT SR (0-1)
Periodo di esposizione	3,27 ± 0,41	2,76 ± 0,55	0,70 ± 0,12	3,53 ± 0,03[a]	0,70 ± 0,05[a]	3,43 ± 0,06 [a]	0,63 ± 0,03 [a]
Settimana post-esposizione	2,78 ± 0,24	3,31 ± 0,10	1,01 ± 0,11	3,09 ± 0,14[b]	0,55 ± 0,02[b]	3,00 ± 0,06[b]	0,49 ± 0,02[b]

Lettere differenti indicano differenza statistica significativa.

CONC SF, MOT SF, VOL SF: concentrazione, motilità e volume nel seme fresco.
MOT SD, VIT SD: motilità e vitalità del seme diluito.
MOT SR, VIT SR: motilità e vitalità del seme refrigerato.

Tabella 7. Tempi realizzati durante la valutazione della libido in recinto (pen mating) e durante l'uso della vagina artificiale espressi in secondi (media ± e.s.).

Secondi di latenza	1° salto in pen mating	1° eiaculato in pen mating	1° salto in Vagina Artificiale	1° eiaculato in Vagina Artificiale
Esposizione	102,75 ± 35,94	119,33 ± 54,58	34,67 ± 7,92	35,00 ± 9,03
Post-esposizione	32,08 ± 15,77	115,71 ± 90,81	28,00 ± 4,49	34,44 ± 6,87

Lettere differenti indicano differenza statistica significati.

Tabella 8. Livelli di testosterone (ng/dl; media ± e.s.).

	Periodo		
Periodo orario	Pre-esposizione	Esposizione	Post-esposizione
8.00	169,65 ± 114,76 *[a]	1133,75 ± 114,76 **	660,88 ± 114,76 ***[a]
10.00	174,33 ± 114,76 *[a c]	1075,35 ± 114,76 **	1266,25 ± 114,76 **[c]
12.00	159,44 ± 114,76 *[a c]	1095,50 ± 114,76 **	1330,25 ± 114,76 **[c]
14.00	190,45 ± 114,76 *[a c]	1434,63 ± 114,76 **	1186,00 ± 114,76 **[c]
16.00	500,38 ± 114,76 *[bc]	1259,36 ± 146,29**	1262,75 ± 114,76 **[c]

Periodi orari: lettere uguali escludono differenze significative (P<0.05) nei livelli di testosteronemia.
Periodi: differente numero di asterischi identifica una differenza significativa nei livelli di testosteronemia.

Tabella 9. Coefficienti di correlazione tra i valori medi dei parametri ematobiochimici e i livelli di TSH, T3.

	TSH1	TSH2	Δ TSH	T3-1	T3-2	ΔT3	T4-1	T4-2	ΔT4
UR 1	ns	ns	ns	ns	ns	**-0,9**	ns	ns	**-0,8**
UR 2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0,8**
GLU2	**-0,7**	ns	**0,75**	**0,8**	ns	ns	ns	ns	ns
ΔGLU	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
COL1	ns	ns	ns	**0,9**	ns	ns	ns	ns	ns
TG1	ns	ns	ns	**0,9**	ns	ns	ns	ns	ns
TG2	ns	ns	ns	**0,8**	ns	ns	ns	ns	ns
BILT1	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	ns	ns	ns
ΔBILT	ns	**-0,9**	ns	Ns	ns	ns	**0,8**	ns	ns
BILI1	ns	ns	ns	Ns	ns	ns	**-0,8**	ns	ns
BILI2	ns	ns	ns	**-0,7**	ns	ns	ns	ns	ns
GGT1	**-0,9**	**-0,8**	**0,83**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
GGT2	**-0,9**	**-0,8**	**0,86**	ns	ns	ns	**0,7**	ns	ns
CK1	**0,8**	Ns	**-0,8**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CK2	Ns	**0,71**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ΔCK	**-0,8**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Ca2	**-0,7**	**-0,7**	**0,71**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P1	**0,9**	ns	**-0,9**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
P2	ns	ns	**-0,8**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ΔP	ns	ns	ns	ns	ns	**0,76**	ns	**0,7**	**0,7**
Mg1	ns	ns	ns	ns	**-0,8**	ns	ns	ns	ns
ΔMg	ns	ns	ns	**0,8**	ns	ns	ns	ns	ns

TSH1, T3-1, T4-1: valori medi delle concentrazioni degli ormoni metabolici nella settimana di pre-esposizione; TSH2, T3-2, T4-2: valori medi delle concentrazioni degli ormoni metabolici nella settimana post-esposizione.
ΔTSH, T3, T4: variazioni nelle concentrazioni tra settimana pre-esposizione e settimana post-esposizione.
UR1, COL1, TG1, BILT1, BILI1, GGT1, CK1, P1, Mg1: valori plasmatici medi nelle concentrazioni di urea, colesterolo, trigliceridi, bilirubina totale e indiretta, gamma-glutamin-transferasi, creatin-chinasi, fosforo e magnesio a inizio settimana di pre-esposizione.
UR2, GLU2, TG2, BILI2, GGT2, CK2, Ca2, P2: valori plasmatici medi nelle concentrazioni di urea, glucosio, trigliceridi, bilitubina indiretta, gamma-glutamin-transferasi, creatin-chinasi, calcio e fosforo a fine settimana di pre-esposizione.
ΔGLU, ΔBILT, ΔCK, ΔP, ΔMg: variazioni nelle concentrazioni plasmatiche di glucosio, bilirubina totale, creatin-chinasi, fosforo e magnesio tra inizio e fine settimana di pre-esposizione.

Tabella 10. Coefficienti di correlazione tra i valori medi dei parametri ematobiochimici e i livelli di testosterone.

	ΔPT	ALB1	ALB2	ΔAST	GGT1	GGT2	ΔGGT	CK1	ΔCK	Mg1	ΔMg
test1	**0,7**	ns	ns	ns	ns	ns	**-0,7**	ns	ns	**0,7**	ns
test2	ns	**0,7**	ns	**0,72**	**0,74**	ns	ns	**-0,7**	**0,7**	ns	ns
test3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Δtest1	ns	**0,7**	ns	**0,72**	ns	ns	ns	**-0,8**	**0,8**	ns	ns
Δtest2	ns	**-0,8**	**-0,8**	**-0,8**	**-0,9**	**-0,8**	**0,93**	ns	ns	ns	ns

Test1: testosteronemia media nella settimana di pre-esposizione; test.2: testosteronemia media nel periodo di esposizione; test.3: testosteronemai media nella settimana post-esposizione. Δ1 test:: variazione nei valori medi di testosteronemia tra settimana pre-esposizione e periodo di esposizione; Δ2 test:.: variazione nei valori medi di testosteronemia tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione.
ALB1, GGT1, CK1, Mg1: concentrazioni ematiche medie di albumina, gamma-glutamil-transferasi, creatin-chinasi e magnesio a inizio della settimana di pre-esposizione.
ALB2, GGT2: concentrazioni ematiche medie di albumina e gamma-glutamil-transferasi a fine settimana di pre-esposizione.
ΔPT, ΔAST, ΔGGT, ΔCK, ΔMg: variazioni nelle concentrazioni ematiche di proteine totali, aspartatato-amino-transferasi, gamma-glutamil-transferasi, creatin chinasi e magnesio tra inizio e fine della settimana di pre-esposizione.

Tabella 11. Coefficienti di correlazione tra i valori medi di testosterone e di TSH, T3, T4 .

	Test.1	Test.2	Test.3	Δ1test	Δ2test	Δ3test	TSH1	TSH2	ΔTSH	T3-1	T3-2	ΔT3	T4-1	T4-2	ΔT4
Test.1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Test.2			ns	**0,95**	**-0,78**	Ns	**-0,78**	Ns	**0,77**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Test.3				ns	ns	**0,89**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Δ1test					ns	ns	**-0,76**	ns	**-0,73**	ns	ns	**0,73**	ns	ns	ns
Δ2test						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Δ3test							ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TSH 1								**0,88**	**0,99**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TSH 2									**-0,81**	ns	ns	ns	**-0,88**	ns	ns
ΔTSH										ns	ns	ns	ns	ns	ns
T3-1											ns	ns	ns	ns	ns
T3-2												**0,85**	ns	ns	**0,9**
ΔT3													ns	ns	**0,88**
T4-1														ns	ns
T4-2															**0,77**
ΔT4															

Test1: testosteronemia media nella settimana di pre-esposizione; test.2: testosteronemia media nel periodo di esposizione; test.3: testosteronemai media nella settimana post-esposizione. Δ1 test:: variazione nei valori medi di testosteronemia tra settimana pre-esposizione e periodo di esposizione; Δ2 test:.: variazione nei valori medi di testosteronemia tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione; Δ3 test.: variazione nei valori medi di testosteroneia tra la settimana pre-esposizione e quella post-esposizione.
TSH1, T3-1, T4-1: valori medi delle concentrazioni degli ormoni metabolici nella settimana di pre-esposizione; TSH2, T3-2, T4-2: valori medi delle concentrazioni degli ormoni metabolici nella settimana post-esposizione.
ΔTSH, T3, T4: variazioni nelle concentrazioni tra settimana pre-esposizione e settimana post-esposizione.

Tabella 12. Coefficienti di correlazione tra i livelli medi di testosteronemia, di TSH, T3, T4 e dei parametri di libido.

	Salto PM1	Δsalto PM	Eia PM1	Eia PM2	Δeia PM	Avv VA	Salto VA1	Salto VA2	Δsalto VA	Eia VA1	Eia VA2	Δei aVA
Test1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Test2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0,86**	ns	ns	ns	ns	ns
Test3	ns	ns	**-0,85**	ns	**0,86**	Ns	ns	**0,71**	ns	ns	ns	ns
Δtest1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0,91**	ns	ns	ns	**0,93**	ns
Δtest2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Δtest3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
TSH1	**0,86**	**-0,84**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0,86**	**-0,85**	ns	ns
TSH2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ΔTSH	ns	**0,88**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0,94**	ns	ns	ns
T3-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T3-2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Δ T3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**0,94**	ns	ns	ns
T4-1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T4-2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Δ T4	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
T avvPM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**-0,99**	ns	ns
SaltoPM1		**-0,99**	ns	ns	ns	**-0,99**	ns	ns	ns	ns	ns	**1**
SaltoPM2		ns	ns	**0,99**	ns	ns	ns	ns	**0,83**	ns	ns	ns
ΔsaltoPM			ns	ns	ns	**0,99**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EiaPM1				ns	**-0,99**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
EiaPM2					ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
ΔeiaPm						ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
AvvVA							ns	ns	ns	ns	ns	ns
SaltoVa1								ns	ns	**0,97**	ns	ns
SaltoVa2									ns	ns	**0,79**	ns
ΔsaltoVA										**-0,92**	ns	**0,96**
EiaVA1											ns	ns
EiaVA2												ns
Δeia VA												

Test1: testosteronemia media nella settimana di pre-esposizione; test.2: testosteronemia media nel periodo di esposizione; test.3: testosteronemai media nella settimana post-esposizione. Δ1 test:: variazione nei valori medi di testosteronemia tra settimana pre-esposizione e periodo di esposizione; Δ2 test:.: variazione nei valori medi di testosteronemia tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione; Δ3 test.: variazione nei valori medi di testosteroneia tra la settimana pre-esposizione e quella post-esposizione.
TSH1, T3-1, T4-1: valori medi delle concentrazioni degli ormoni metabolici nella settimana di pre-esposizione; TSH2, T3-2, T4-2: valori medi delle concentrazioni degli ormoni metabolici nella settimana post-esposizione.
ΔTSH, T3, T4: variazioni nelle concentrazioni tra settimana pre-esposizione e settimana post-esposizione.
TavvPm, TavvVa: tempo di avvicinamento nelle prove di pen mating e durante l'uso della vagina artificiale.
SaltoPm1, EiaPm1, SaltoVa1, EiaVa1: tempi di latenza per il primo salto e per la prima eiaculazione in pen mating e durante l'uso di vagina artificiale nel periodo di esposizione.
SaltoPm2, EiaPm2, SaltoVa2, EiaVa2: tempi di latenza per il primo salto e per la prima eiaculazione in pen mating e durante l'uso di vagina artificiale nel periodo di post-esposizione.
ΔSaltoPm, ΔEiaPm, ΔSaltoVa, ΔEiaVa: variazioni nei tepi di manifestazione di salto ed eiaculazione in pen mating e durante l'uso di vagina artificiale tra periodo di esposizione e settimana post-esposizione.

4 DISCUSSIONE

L'esperimento è stato condotto tra il 16 giugno e il 7 luglio per evitare che i meccanismi di inibizione stagionale dell'attività riproduttiva fossero tanto marcati da andare ad inficiare i risultati dello studio. La decisione di effettuarlo in stagione tardo-anaestrale ha permesso di ottenere una risposta positiva in una percentuale di animali decisamente maggiore rispetto a un lavoro analogo condotto nell'ariete in stagione non riproduttiva (Gonzales et al., 1988).

4.1 Esame clinico e strumentale

Nella settimana di pre-esposizione gli animali sono stati selezionati in modo da rappresentare un campione omogeneo e significativo per l'indagine che su di loro doveva svolgersi. A questo scopo si è limitato sia il range di età sia di BCS per l'accesso all'esperimento, e similmente lo stato fisico generale e dell'apparato riproduttore dovevano non mostrare anomalie. L'unico animale che si discostava da tali indicazioni era il becco n° 3, che ha rappresentato per molte valutazioni un termine di paragone negativo.

Il fatto che ogni animale sicuramente ricevesse una quantità di cibo adeguata e di qualità appropriata ha reso infine possibile escludere le interferenze sulla valutazione andrologica della qualità dell'alimentazione (Walkden-Brown et al., 1994).

L'utilizzo dell'ecografia testicolare ha permesso in due becchi di diagnosticare la presenza di calcificazioni e degenerazioni, potenzialmente in grado di influire sulla qualità seminale, che una valutazione limitata all'ispezione e alla palpazione non avrebbe sicuramente rilevato (fig. 30). Nel becco 3 ha invece consentito di formulare una diagnosi eziologica estremamente precisa, confermata dall'esame anatomo-patologico (fig. 31).

Il calcolo della pixel intensity ha fatto emergere una sostanziale omogeneità in tutti i testicoli ad eccezione del testicolo sinistro, atrofico, del becco n° 3: la sua intensità ecografica era decisamente inferiore al

valore medio (149,94 vs. 230,57). Questa distribuzione dei risultati si rispecchia anche nell'analisi degli indici di correlazione che conferma ancora una volta i legami tra la testosteronemia e il comportamento e tra la stessa e gli ormoni tiroidei, ma soprattutto sostiene l'ipotesi per cui un animale in scadenti condizioni fisiche (sia generali sia dell'apparato riproduttore) difficilmente sarà in grado di rispondere efficacemente all'effetto femmina.

I valori medi dei parametri emato-biochimici rientrano nella norma rispetto agli standard di specie in entrambe le misurazioni effettuate (Drackley et al., 1989; Rossi et al., 2000; Perez et al., 2003; Mbuh, Mbwaye, 2005; Ismail et al., 2008).

L'analisi della varianza di tali parametri (tabella 4) tra inizio e fine settimana pre-esposizione è stata condotta allo scopo di valutare la stabilità dello stato metabolico negli animali. L'unica differenza significativa emersa è stata quella riguardante la glicemia, che è passata da 3,35 a 3 mmol/l; ad essa si è associata anche una diminuzione media (non statisticamente significativa) delle concentrazioni ematiche di trigliceridi e colesterolo. Tali dati lasciano presumere che in questa settimana ci sia stata una parziale mobilitazione delle riserve energetiche, ma che lo stato metabolico generale del gruppo si sia mantenuto costante.

La concentrazione media di CK ha visto una brusca diminuzione, non statisticamente significativa, nell'intervallo di tempo considerato. Ciò è giustificabile interpretando le concentrazioni dei singoli animali (fig. 32): mentre in sette becchi il livello medio è rimasto sostanzialmente invariato, nel n° 3 si è passati da 844 a 189 UI/l. Questo dato sembra testimoniare l'efficacia degli sforzi messi in atto al fine di garantire delle condizioni fisiche il più possibile omogenee all'interno del campione.

I valori medi di T3 e T4 rientrano nel range di riferimento per la specie caprina (Todini et al., 2006).

L'analisi della varianza effettuata tra i valori medi degli ormoni tiroidei di inizio e fine esperimento è stata condotta per indagare l'impatto che

l'effetto femmina e la ripresa dell'attività riproduttiva stagionale possono avere sull'equilibrio metabolico del becco.

Sebbene i valori medi di TSH e T3 diminuiscano tra la valutazione pre-esposizione e quella post-esposizione la differenza non è statisticamente significativa: questo significa che i becchi sono stati in grado di rispondere alla ripresa dell'attività sessuale senza andare ad alterare l'equilibrio omeostatico metabolico. Questa capacità è estremamente vantaggiosa nel maschio riproduttore, che durante la stagione riproduttiva sarà chiamato a sostenere uno sforzo notevole dal punto di vista energetico.

Ad ogni modo le variazioni nei livelli sierici di T3 e TSH, anche se non significative, sono coerenti con quanto riportato da Todini a proposito della relazione tra gli ormoni tiroidei e l'attività riproduttiva nella specie caprina: la loro concentrazione diminuisce al diminuire della lunghezza del giorno e quindi con l'inizio della stagione riproduttiva. La stessa associazione è stata riscontrata nell'ariete e nel cervo rosso da Zamiri e Khodaei (2005) e la causa è stata individuata nel plausibile ruolo della tiroide nella sopressione della stagione riproduttiva annuale; anche in queste specie la concentrazione di T3 circolante aumenta nel periodo di transizione allo stato non-riproduttivo.

I livelli medi di testosterone riscontrati sono concordi con quelli ottenuti da Walkden-Brown et al. nel 1994 in uno studio accentrato sull'effetto femmina.

Sui dati concernenti la testosteronemia è stata condotta un'analisi di varianza, che tenesse in considerazione le concentrazioni ottenute alle diverse ore del giorno e le confrontasse tra i diversi momenti dell'esperimento. Da questa emerge che la testosteronemia dei prelievi compiuti tra le 10^{00} e le 16^{00} nella settimana pre-esposizione è statisticamente differente dalla stessa sia durante il periodo di esposizione che in quello post esposizione. In considerazione di questo dato e facendo riferimento allo studio di Zarazaga et al.(2009) che stabilisce nella concentrazione di 500 ng/dl di testosterone il valore soglia oltre il quale l'animale può essere considerato in stagione riproduttiva, si

evince che gli animali, grazie all'effetto femmina, siano di fatto divenuti sessualmente attivi.

Si può però anche notare come, nelle settimane pre- e post-esposizione, la testosteronemia delle 8^{00} sia sempre inferiore a quella dei prelievi successivi. La medesima tendenza emerge anche dallo stesso studio di Walkden-Brown, nel quale è particolarmnte evidente successivamente all'introduzione della capra in estro. Per giustifiare tale riscontro si può fare riferimento a un lavoro di Sharpe (1984); in tale studio viene ipotizzata l'esistenza di un "ormone testicolare di stimolo per il rilascio di LH" (tLHRH), prodotto dalle cellule del Sertoli, che agisce sulle cellule del Leydig per stimolarne la secrezione di testosterone. In presenza di livelli fisiologici di LH il tLHRH provoca un aumento del testosterone nel liquido intratubulare; se la dose di LH aumenta, l'effetto stimolante del tLHRH invece diminuisce, e a dosi molto alte di LH il suo effetto diviene infine inibitorio. Poiché i livelli di testosterone intratubulari determinano una variazione degli androgeni attivi sia sulle cellule del Sertoli sia nella circolazione sistemica si può supporre che i meccanismi di autoregolazione intratesticolari possano intervenire anche sulle concentrazioni ematiche degli androgeni stessi. In conclusione quindi il fatto che la testosteronemia nel primo prelievo del mattino sia inferiore a quella dei prelievi successivi potrebbe riflettere un'autoregolazione volta a inibirne valori eccessivamente alti. Il fatto che invece i valori successivi tendano a rialzarsi è attribuibile allo stimolo fornito dalla capra in estro. Secondo Walkden-Brown la risposta in termini di produzione androgenica nella maggior parte degli animali avviene già entro i primi 20 minuti dall'introduzione alla capra, in altri entro i 220 minuti e nella minoranza dei becchi entro 3-4 ore.

In molti degli studi sperimentali sulla testosteronemia (Sanford et al., 1974; Gonzalez et al, 1988; Walkden-Brown et al., 1994) nei piccoli ruminanti i prelievi giugulari avvengono a intervalli di venti minuti; ciò consente di evidenziare un andamento pulsatile della concentrazione che nel presente studio viene parzialmente persa. Ciononostante, per il

monitoraggio dell'efficacia dell'effetto femmina, la scelta di campionare ogni 2 ore si è rivelata altrettanto efficace ed ha permesso di sgravare notevolmente la mole di lavoro su campo.

Per quanto non siano emerse differenze significative nei valori di testosteronemia tra i diversi becchi può rivelarsi utile analizzarne l'andamento individuale all'interno del medesimo periodo (fig. 35).

È evidente come l'unico becco a non superare la soglia dei 500 ng/dl nel periodo di esposizone sia il becco n° 3. Come emerge sia dall'ecografia testicolare che dall'esame autoptico la presenza dei granulomi spermatici in questo animale aveva provocato fibrosi e atrofia imponenti in uno dei due testicoli e probabilmente aveva in parte compromesso anche la funzionalità dell'altro, di modo tale che la produzione di testosterone fosse meno efficiente rispetto agli altri becchi.

Discorso simile può essere fatto pure per l'autoregolazione testicolare della produzione androgenica (fig. 36) nella settimana post-esposizione: il becco n° 3 è l'unico in cui tale variazione sia poco visibile.

Sulle tabelle 9 e 10 possono essere effettuate alcune considerazioni: 1) i parametri ematobiochimici legati al metabolismo energetico sono correlati positivamente con le concentrazioni dell'ormone T3 misurato nel periodo di esposizione; la natura intrinseca dell'ormone, che porta ad incrementare il substrato energetico a disposizione dell'organismo, spiega adeguatamente i risultati ottenuti; 2) il gamma-glutamil-transferasi è correlato negativamente con il TSH: questo dato riflette probabilmente la scarsa capacità anabolica di animali con alterazioni colestasiche in atto; 3) la creatin-chinasi a inizio settimana pre-esposizione risulta correlata negativamente con i livelli di testosterone nel periodo di esposizione e con la variazione di testosterone tra settimana pre-esposizione e periodo di esposizione. L'unico animale ad avere una creatin-chinasi abnormemente elevata all'inizio della prima settimana era il becco n° 3 (fig.38) e poiché parallelamente il testosterone misurato nel periodo di esposizione ha fatto emergere un'assenza di risposta alla femmina in

estro, la correlazione tra i due avvenimenti conferma l'influenza delle condizioni corporee sulla responsività all'effetto femmina.

Dalla tabella 11 emergono dei dati che sembrano rafforzare l'interpretazione data della diminuzione delle concentrazioni medie di T3 e TSH; poiché il ΔTSH è correlato positivamente con il test.2 e il ΔT3 lo è con il Δtest1, si può supporre che gli animali che meglio hanno risposto all'esposizione abbiano dovuto in qualche modo ricorrere alle riserve energetiche dell'organismo, lasciando meno risorse per il normale anabolismo. Un'indicazione complementare sembra provenire anche dalla correlazione positiva tra TSH1 e ΔTSH: animali fortemente impegnati in attività anaboliche hanno dovuto diminuire molto i livelli di TSH per agevolare la ripresa dell'attività sessuale. Ulteriore conferma deriva dallo stesso studio di Todini e Degadillo che riporta il riscontro di una correlazione negativa tra le concentrazioni plasmatiche di testosterone e di ormoni tiroidei.

4.3 Valutazione della qualità seminale

Il numero di campioni di seme non è omogeneo nella settimana di esposizione individuale perché in questo periodo non è stato possibile ottenerne il prelievo da tutti gli animali in tutte e cinque le prove effettuate e perchè la valutazione del seme diluito e refrigerato non veniva condotta se la concentrazione del seme risultava inferiore ai $3x10^9$ spermatozoi/ml.

Ad eccezione proprio della concentrazione del seme fresco, che nella settimana post-esposizione aveva mediamente un valore inferiore ai $3x10^9$spermatozoi/ml, tutti i parametri erano nella norma e superiori agli standard minimi richiesti per l'utilizzo del seme fresco o refrigerato in fecondazione artificiale (secondo quanto stabilito dal manuale per l'inseminazione AITECH del 2003).

I punteggi assegnati durante la valutazione vedono un peggioramento significativo, tra periodo di esposizione e di post-esposizione, della motilità e della vitalità del seme sia diluito che refrigerato. Questo risultato potrebbe sorprendere, a meno di voler considerare la frequenza di

eiaculazione nelle settimane di esposizione come la causa più probabile. A conferma di questa ipotesi Leboeuf et al. indicano la necessità di due giorni di riposo tra un prelievo e il successivo per i becchi destinati alla produzione di seme, al fine di non comprometterne la qualità. Kaya et al. (2002) hanno indagato approfonditamente tale argomento sul seme dell'ariete, dimostrando come all'aumentare della frequenza dei prelievi declinino progressivamente volume, concentrazione e motilità progressiva mentre vadano ad aumentare le anomalie spermatiche. Questa possibilità era stata considerata nella pianificazione del modello sperimentale, ma si è preferito procedere comunque come descritto nel timore che l'effetto femmina non ricevesse risposte adeguate da parte degli animali.

Il fatto che i valori comunque non migliorino statisticamente tra periodo di esposizione e post-esposizione può essere interpretato come indicativo dell'attendibilità delle previsioni ottenute tramite l'effetto femmina sulla qualità del seme.

4.4 Valutazione della libido

Le valutazioni della libido durante l'utilizzo della vagina artificiale nella settimana di esposizione individuale (effettuati in cinque differenti giorni) hanno ottenuto una risposta non omogenea da parte del gruppo: i becchi n° 3, 5 e 6 hanno immediatamente accettato l'utilizzo della vagina artificiale, mentre nei becchi n° 4, 8 e 7 è stato possibile realizzare i prelievi rispettivamente solo una, due e tre volte; il fatto che quest'ultimi abbiano comunque dimostrato di aver risposto positivamente all'effetto femmina, attraverso l'aumento della testosteronemia, lascia supporre che un minor numero di contatti avrebbe potuto dimostrarsi ugualmente efficace.

Precedenti studi condotti sul becco per lo stesso tipo di valutazione (Silvestre et al., 2009; Zarazaga et al., 2009) ottengono valori paragonabili a quelli riportati in tabella 7.

Anche i tempi di latenza per la prima monta e per il primo eiaculato nelle prove in recinto sono simili a quanto riportato in letteratura (Prado et al., 2003). Il fatto che non emergano differenze significative tra periodo di

esposizione e post-esposizione può far supporre che la valutazione della libido permessa dall'effetto femmina in periodo di transizione possa essere rappresentativa della stessa in stagione riproduttiva.

Nella settimana di esposizione al gruppo non tutti gli animali sono stati testati: il fatto di aver sottoposto alla prova di libido sei becchi nell'arco di una settimana ha provocato nel recinto delle 25 capre l'effetto maschio; pertanto quando gli ultimi due animali dovevano essere sottoposti al test le condizioni dell'esperimento non erano più paragonabili a quelle precedenti, e punteggi migliori potevano venir attribuiti più all'intensa stimolazione che non alle caratteristiche proprie del becco. Probabilmente volendo ripetere il protocollo si dovrebbe tentare di condensare i test in recinto nell'arco di un periodo di tempo molto minore.

La tabella 12, che analizza le correlazioni tra i comportamenti riproduttivi e le concentrazioni di testosterone e ormoni tiroidei, vede emergere alcuni dati significativi: le correlazioni tra TSH1, ΔTSH e ΔT3 con saltoPM1, ΔsaltoPM e ΔsaltoVA sembrano fornire un'ulteriore prova all'interpretazione data in precedenza del ruolo che gli ormoni tiroidei sostengono in riproduzione nella specie caprina. Presenza di alti livelli di TSH1 e piccole variazioni nelle sue concentrazioni si manifestano in animali che necessitano di lunghi tempi per effettuare il primo salto in pen-mating, e che non vedono una diminuzione dei tempi nel passaggio tra settimana di esposizione e post-esposizione. Invece gli animali in cui la concentrazione di TSH diminuisce migliorano anche i propri tempi nell'effettuare il primo salto sia in pen-mating che durante l'uso della vagina artificiale; similmente più diminuisce la concentrazione di T3 migliori saranno i tempi per l'effettuazione del primo salto in vagina artificiale.

5 CONCLUSIONI

In considerazione di quanto emerso nel presente lavoro si può concludere che l'effetto femmina consente la valutazione del potenziale riproduttivo del becco in stagione tardo-anaestrale, rendendo possibile analizzare precocemente anche quei parametri la cui indagine solitamente è relegata alla stagione riproduttiva.

L'esame dello stato fisico complessivo e dell'apparato riproduttore si è ovviamente dimostrato rilevante nel periodo di reclutamento dei maschi, anche nell'ottica di fornire loro le migliori condizioni per affrontare la valutazione della fertilità. L'utilizzo dell'ecografia in quest'ambito, già assodato in altre specie, si è dimostrato fondamentale perchè in grado di aumentare notevolmente la sensibilità del metodo adottato.

La determinazione iniziale degli ormoni tiroidei è particolarmente utile per valutare lo stato metabolico basale dell'animale mentre la ripetizione dell'esame a fine protocollo fornisce indicazioni sull'impatto che la ripresa dell'attività riproduttiva ha avuto su tale parametro.

La determinazione delle concentrazioni ematiche di testosterone è fondamentale in sé stessa (questo ormone è correlato con tutti i principali caratteri riproduttivi) ma soprattutto perché permette di appurare se l'animale ha risposto all'effetto femmina efficacemente. Avendo evidenziato nel test che i livelli androgenici basali aumentano sempre se l'effetto femmina ha provocato una risposta positiva, si può supporre che un numero inferiore di misurazioni potrebbe soddisfare ugualmente tali richieste; si potrebbe per esempio limitare i prelievi a quelli delle 8^{00} e delle 14^{00}, da ripetere una volta per ogni periodo.

L'indagine della libido è fondamentale nella valutazione della fertilità, e si è dimostrato che le misurazioni ottenute durante il periodo di esposizione sono rappresentative di quelle che saranno le performance del becco durante la stagione riproduttiva.

Per quanto riguarda il seme è stata confermata l'ipotesi secondo cui la frequenza di prelievo prevista dal presente studio è eccessiva e ha come

risultato l'impoverimento della qualità seminale successiva al periodo di esposizione. E' pertanto da valutare l'opportunità di diminuire il numero di contatti previsti nell'intervallo di tempo; poiché l'effetto femmina si è verificato anche in animali che hanno eiaculato solo una volta durante l'esposizione individuale, una successiva indagine potrebbe verificare se questa condizione può essere efficace nella totalità degli animali.

Un limite alla validità di quanto descritto è sicuramente rappresentato dall'esigua numerosità del campione. Uno sviluppo successivo del tema potrebbe consistere nella valutazione (magari applicata a meno parametri) di un numero maggiore di animali, estendendola possibilmente anche alla piena stagione riproduttiva.

In conclusione sono stati definiti dei riferimenti per la valutazione andrologica del becco in tarda stagione anaestrale, sebbene i limiti emersi propongano diversi spunti per ulteriori sviluppi possibili.

BIBLIOGRAFIA

Aguggini, G., Beghelli, V., Giulio, L., 2006. Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia. UTET, Torino.

Ahmad, N., Noakes, D. E., England, D. E., 2000. Ultrasonography of spontaneous lesions of the genital system of three rams, and their influence on semen quality. Veterinary Record 146, 10 – 15.

Ahmad, N., Noakes, D. E., Subandrio, A. L., 1991. B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. Veterinary Record 128, 491 – 496.

Ahmad, N., Noakes, D. E., Middleton, D. J., 1993. Use of ultrasound to diagnose testicular degeneration in a goat. Veterinary Record 132, 436 – 439.

Anon, T., 1995. The veterinary examination of bulls. Australian Association of Cattle Veterinarians, Indooroopilly, Queensland, Australia.

Arteaga, A.A., Barth, A.D., Brito, L.F.C, 2005. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal inulation in beef bulls. Theriogenology 64, 408-415.

Barth, A.D., 1993. Bull breeding soundness. Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Saskatchewan, Canada.

Bertram, J.D., FordYce, G., McGowan, M.R., Jayawardhana, G.A., Fitzpatrick, L.A., Doogan, V.J., De Faveri, J., Holroyd, R.G., 2002. Bull selection and use in Northern Australia 3. Serving capacity test. Animal Reproduction Science 71, 51-66.

Bongso, T.A., Jainudeen, M.R., Siti Zahrah, A., 1982. Relationship of scrotal circumference to age, body weight and onset of spermatogenesis in goats. Theriogenology 8, 513-24.

Bruere, A.N., West, D.W., 1993. The sheep: health, disease & production. Palmerston North: Foundation for Veterinary Continuing Education of the New Zealand Veterinary Association.

Chenoweth, P. J., 2004. Evaluation of natural service bulls – the 'other' BSE. The Veterinary Journal 168, 211-212.

Chenowith, P.J., 1997. Veterinary clinics of North America: food animal practice 13, 131-138.

Chenowith, P.J., 1986. Current therapy in theriogenology. Morrow, Philadelphia.

Chenoweth, P. J., Hopkins, F. M.,Spitzer, J. C., Larsen, R. E, 1993. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. Theriogenology Handbook:B-10

Chenoweth, P. J., Spitzer, J. C., Hopkins, F. M., 1992. A new bull breeding soundness evaluation form. Proceedings of the Society for Theriogenology AGM, pp 63-70.

Colenbrander, B., Gadella, B.M., Stout, T.A., 2003. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. Reproduction in Domestic Animals 38, 305-11.

Crichton, J.S., Lishman, A.W., Lesche, S.F., 1987. Failor to demonstrate a relationship between beef bull libido and conception rate. South African Journal of Animal Science 17, 27-31.

Delgadillo, J.A., Leboeuf, B., Chemineau, P., 1993. Maintenance of sperm production in bucks during a third year of short photoperiodic cycles. Reproduction, Nutrition, Development 33, 609-617.

Detweiler, G., Gipson, T., Merkel, R.C., Goetsch, A., Sahlu, T., 2008. Body condition scores in goats. Proc. 23rd Ann. Goat Field Day, Langston University, Langston.

Djang, K.T., Harun, B.A., Kumi-Diaka, J., Yusuf, H.I., Udomah, M.G., 1988. Clinical and anatomical studies of the camel (camelus dromedarius) genitalia. Theriogenology 30, 1023-31.

Drackley, J.K., Kim, Y.K., Strang, B.D., Young, J.W., 1989. Metabolic responses of lactating goats to fees resrtiction and dietary 1,3-butanediol. Journal of Dietary Science 72, 3204-3211.

Foote, R. H., Munkenbeck, N., Greene, W. A., 1976. Testosterone and libido in Holstein Bulls of Various Ages. Journal of Dairy Science 59, 2011-2013.

Fthenakis, G.C., Karagiannidis, A., Alexopoulos, C., Brozos, C., Saratsis, P., Kyriakis, S., 2001. Clinical and epidemiological findings during examination in 47 flocks in southern Greece. Preventive Veterinary Medicine 52, 43-52.

Gouletsou P. G., Amiridis G. S., Cripps P. J., Lainas T., Deligiannis K., Saratsis P., Fthenakis G. C., 2003. Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymes of rams. Theriogenology 59, 1959 –1972.

Gabor, G., Sasser, R.G., Kastelic, J.P, Mezes, M., Falkat, Gy., Bozo, S., Csik, J.V., Barany, I., Hidas, A., Szasz, F., Boros, G., 1998. Computer analysis og video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. Theriogenology 50, 223-228.

Guida pratica per veterinari e tecnici AITECH. “Divulgazione delle tecniche di Inseminazione Artificiale delle capre in Europa”, 2003

Hermes, R., Hildebrandt, T.B., Blottner, S., Walzer, C., Silinski, S., Patton, M.L., Wibbelt, G., Schwarzenberger, Göritz, F., 2005. Reproductive soundness of captive southern and northern white rhinoceroses (Ceratotherium simum simum, C.s. cottoni): evaluation of male genital tract morphology and semen quality before and after cryopreservation. Theriogenology 1, 219-38.

Hurtgen, J. P., 1992. Evaluation of the stallion for breeding soundness. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 8, 149-65.

INTERVET, 2003. “Compendium of Animal Reproduction”. Intervet International.

Iyer, C.P., Rajan, A., 1979, Kerala Journal of Veterinary Science 10, 301.

Ismail, Z.A.B., Al-Majali, A.M., Amireh, F., Al-Rawashdeh, O.F., 2008. Metabolic profiles in goat does in late pregnancy with and without subclinical pregnancy toxemia. Veterinary Clinical Pathology 37, 434-437.

Javed, M.T., Khan, A., Kausar, R., 1998. Influence of age and season on body mass, scrotal circumference and sexual behaviour of Nili-Ravi buffalo bulls. Veterinarski Arhiv 68, 219-229.

Karaca F., Aksoy M., Kaya A., Ataman M. B., Tekeli T., 1999. Spermatic granuloma in the ram: diagnosis by untrasonography and semen characteristics. Veterinary Radiology & Ultrasound 40, 402 – 406.

Kastelic, J.P., Cook, R.B., Pierson, R.A., Coulter, G.H., 2001. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. The Canadian Journal of Veterinary Research.

Kastelic, J.P., Thundathil, J.C., 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. Reproduction in Domestic Animals.

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 Research 44, 153-158.

Keen J.E., Rupp, G.P., Wittenberg, P.A., Walker, R.E., 1999. Breeding soundness examination of North American bison bulls. Journal of American Veterinary Medical Association 15, 1212-1217

Kilgour, R.F., Whale, R.G., 1980. The relation between activity of rams in pens and subsequent flock mating performance. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry.

Konig, H.E., Liebich, H.G., 2002. Anatomia dei mammiferi domestici. Piccin, Padova.

Leboeuf, B., Delgadillo, J.A., Manfredi, E., Piacere, A., Clement, V., Martin, P., Pellicer, M., Bouè, P., de Cremoux, R., 2008. Management of goat reproduction and insemination for genetic improvement in France. Reproduction in Domestic Animals 43, 379-385.

Leboeuf, Manfredi, Boue, Piacere, Brice, Baril, Broqua, Humblot, Terqui, 1998. L'insemination artificielle et l'amelioration genetique chez la chevre laitiere en France. INRA production animal.

Leboeuf, B., Restall, B., Salamon, S., 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Animal Reproduction Science 62, 113-141.

Lee Owen, N., 1977. The illustrated standard of the dairy goat. Dairy goat journal publishing corporation, Liverpool.

Linklater, Smith, 1993. Diseases and disorders of the sheep and goat. Mosby-Wolfe, Philadelphia.

Messieri, A., Moretti, B., 1963. Semiologia e Diagnostica Medica Veterinaria. Libreria Universitaria Tinarelli, Bologna.

Makarechian, M., Farid, A., 1985. The useulness of breeding soundness evaluation in preciding natural service fertility of bulls in multiple-sire mating. Theriogenology 23, 887-893.

Manfredi, E., Leboeuf, B., Bodin, L., Bouè, P., Humblot, P., 1998, Renc., Rech., Ruminants 5, 37-40.

McGowan, M.R., Bertram, J.D., Fordyce, G., Fitzpatrick, L.A., Miller, R.G., Jayawardhana, G.A., Doogan, V.J., De Faveri, J., Holroyd, R.G., 2002. Bull selection and use in northern Australia 1. Physical traits. Animal Reproduction Science 71, 25-37.

Mellado, M., Càrdenas, C., Ruìz F., 2000. Mating behavior of bucks and does in goat operations under range conditions. Applied Animal Behaviour Science 67, 89-96.

Mbuh, J.V., Mbwaye, J., 2005. Serological changes in goats experimentally infected with *Fasciola Gigantica* in Buea sub-division of S.W.P. Cameroon. Veterinary Parasitology 131, 255-259.

Noaks, D.E., Parkinson, T.J., England, G.C.W., 2001. Arthur's veterinary reproduction and obstetrics. Sauders, Philadelphia.

Nyland, T.G., Mattoon, J.S., 2002. Small Animal Diagnostic Ultrasound. Saunders, Philadelphia.

Paccamonti, D. L., Buiten, A.V., Parlevliet, J.M., Colenbrander, B., 1999. Reproductive parameters of miniature stallions. Theriogenology 51, 1343-1349.

Perez, J.M., Gonzales, F.J., Granados, J.E., Perez, M.C., Fandos, P., Soriguer, R.C., Serrano, E., 2003. Hematologic and biochemical reference intervals for spanish ibex. Journal of Wildlife Diseases 39, 209-215.

Perkins, A., Fitzgerald, J.A., Prince, E.O., 1992. Sexual Performance f Rams in Serving Capacity Test Predicts Success in Pen Breeding. Journal of Animal Science 70, 2722-2725.

Perkins, A., Roselli, C. E., 2007. The Ram a s a Model for Behavioral neuroendocrinology. Hormones and Behavior 52, 70-77.

Prado, V., Orihuela, A., Lozano, S., Perez-Leon, I., 2003. Effect on ejaculatory performance and semen paramenters of sexually satiated male-goats after changing the stimulus female. Theriogenology 60, 261-267.

Price, E.O., Borgwardt, R., Orihuela, A., Dally, M.R., 1998. Sexual stimulation in male sheep and goats. Applied Animal Behaviour Science 59, 317-322.

Pugh, 2000. Sheep and Goat medicine. Saunders, Philadelphia.

Resko, J.A., Perkins, A., Roselli, C.E., Fitzgerald, J.A., Choate, J.V.A, Stormshak, F., 1996. Endocrine Correlates of Partner Preference Behavior in Rams. Biology of Reproduction 55, 120-126.

Rossi, R., Dorig, S., Del Prete, E., Scharrer, E., 2000. Suppression of feed intake after parenteral administration of d-b-hydroxybutyrate in pygmy goats. Journal of Veterinary Medicine 47, 9-16.

Sanford, L.M., Palmer, W.M., Howland, B.E., 1974. Influence of sexual activity on serum levels of LH and testosterone in the ram. Canadian Journal of Animal Science 54, 579-585.

Schanbacher, B.D, Lunstra, D.D., 1976. Seasonal changes in sexual activity and serum levels of LH and Testosterone in Finish Landrace and Suffolk Rams. Journal of Animal Science 43, 644-650.

Sharpe, R.M., 1984. Intratesticular factors controlling testicular function. Biology of Reproduction 30, 29-49.

Silvestre, M.A., Salvador, I., Sanchez, J.P., Gomez, E.A., 2009. Effect of changing female stimulus on intensive semen collection in young

Murciano-Granadina male goats. Journal of Animal Science 82, 1641-1645.

Smith, M., Sherman, D., 1994. Goat medicine. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.

Söderquist, L., Hultén, F., 2006. Normal values for the scrotal circumference in rams of gotlandic breed. Reproduction in Domest Animals 41, 61-2.

Theriogenology Course, 1988. Reproduction in the ram. Abridged notes from Sheep Production. Handbook, Supplemental Information.

Todini, L., Delgadillo, J.A., Debenedetti, A., Chemineau, P., 2006. Plasma total T3 and T4 concentrations in bucks as affected by photoperiod. Small Ruminant Research 65, 8-13.

Walkden-Brown, S.W., Restall, B.J., Norton, B.W., Scaramuzzi, R.J., 1994. The 'Female Effect' in Australian Cashmere Goats: effect on season and quality of diet on the testosterone response of bucks to oestrus does. Journal of Reproduction and Fertility 100, 521-531

Watson, P.F., 1990. Marshall's Physiology of Reproduction. Lamming, Edimburgh.

Wodzicka-Tomaszewska, M., Kilgour, R., Ryan, M., 1981. Libido in the larger farm animals: a review. Applied Animal Ethology 7, 203-238.

Youngquist, R.S., Threlfall, W.R., 2007. Current therapy in large animal theriogenology. Saunders, St. Louis.

Zamiri, M.J., Khodaei, H.R., 2005. Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of iranian fat-tailed rams. Animal Reproduction Science 88, 245-255.

Zarazaga, L.A., Guzman, J.L., Dominguez, C., Perez, M.C., Prieto, R., 2009. Effects of season and feeding level on reproductive activity and semen quality in Payoya buck goats. Theriogenology 71, 1316-1325.

RINGRAZIAMENTI

Al Dott. Calogero Stelletta, perchè senza la sua pazienza e la sua disponibilità non ci sarei riuscita.

Alla Dott.ssa Maria Dattena, perché mi ha fatto il complimento migliore che abbia mai ricevuto.

Alla Dott.ssa Anna-Lisa Stefani per il prezioso aiuto.

Alla mia famiglia, perché ha capito e mi ha sopportata.

A Chicco, perché non mi ha esorcizzata ma incredibilmente contiuna a volermi bene.

A Marta ed Elettra perché stare con loro in appartamento è stato eccezionale. Alla Ludo per questo e per altri mille motivi.

A tutti i miei veri amici, perché conoscerli è un privilegio..