



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**  
**Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute**  
**Corso di laurea magistrale a ciclo unico in**  
**MEDICINA VETERINARIA**

**TESI DI LAUREA**

**CONGELAMENTO DI MATERIALE SEMINALE EQUINO POST**  
**CASTRAZIONE**

**Relatore Dott.ssa MARIA ELENA FALOMO**

**Correlatore Prof. ROBERTO MANTOVANI**

**Laureanda SUSANNA BRAVO**  
**Matricola n. 443233/MV**

**ANNO ACCADEMICO      2012 - 2013**



## *RINGRAZIAMENTI*

*Un ringraziamento particolare alla Dott.ssa Maria Elena Falomo per la disponibilità, gli insegnamenti ed il sostegno morale durante il periodo più difficile della mia vita.*

*Ringrazio il Prof. Roberto Mantovani per avere gentilmente collaborato alla stesura della tesi.*

*Ringrazio la Dott.ssa Lea Lizier e Chiara Ruzzier della " LC STALLONI " di Vigonza (PD) per avermi permesso di usufruire delle infrastrutture.*

*Ringrazio la mia famiglia per non aver mai mollato ed avermi sempre sostenuta.*



# SOMMARIO

Riassunto.....	1
<i>Abstract</i> .....	2
1 INTRODUZIONE.....	3
1.1 LA CASTRAZIONE.....	3
1.2 LA PUBERTÀ.....	4
1.3 LA MATURAZIONE SPERMATICA EPIDIDIMALE.....	6
1.4 REFRIGERAZIONE E CRIOCONSERVAZIONE DI SEME EPIDIDIMALE.....	9
1.5 RUOLO DEL PLASMA SEMINALE.....	10
1.6 NORMATIVA PER APPROVARE UNO STALLONE.....	16
1.7 INTERESSE AL CONGELAMENTO DI MATERIALE SEMINALE EPIDIDIMALE.....	19
2 OBIETTIVI.....	21
3 MATERIALI E METODI.....	22
3.1 DISEGNO SPERIMENTALE.....	22
3.2 MATERIALI.....	23
3.3 METODI.....	24

4	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	28
4.1	ANALISI STATISTICA.....	28
4.2	ANALISI DELLA VARIANZA.....	29
4.3	ANALISI DEI CONTRASTI.....	30
4.4	ANALISI DEI PARAMETRI SU SEME FRESCO.....	32
4.5	ANALISI DEI PARAMETRI SU SEME CONGELATO.....	35
4.6	CONFRONTO FRA EXTENDER DA CONGELAMENTO.....	38
4.7	ANALISI DELL' INTEGRITÀ DELLE MEMBRANE CELLULARI.....	42
5	CONCLUSIONI.....	45
6	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	47

## RIASSUNTO

La crioconservazione del seme epididimale equino è importante per preservare materiale genetico ottenuto da testicoli di stalloni castrati o morti.

Questo studio valutava la motilità e l' integrità di membrana degli spermatozoi da campioni seminali prelevati dalla coda dell' epididimo di sei stalloni in quattro condizioni: 1) sul seme fresco a 0 ore (F\*A); 2) sul seme fresco dopo 24 ore di refrigerazione a +4°C (F\*B); 3) sul seme congelato a 0 ore (C\*A); 4) sul seme congelato dopo refrigerazione a 24 ore (C\*B). Dopo la castrazione un testicolo è stato diluito con Equipro™ ed analizzato immediatamente (F\*A), mentre il contro laterale è stato refrigerato per 24 ore a +4°C prima di ottenere il seme (F\*B). I campioni sono stati analizzati in due tempi: a) dopo l' estrazione del seme, previa diluizione con due extender da congelamento differenti messi a confronto (X: Palmer modificato e Y: Egg Tech® ); b) post scongelamento. La motilità spermatica, espressa dalle percentuali di spermatozoi motili e progressivi era simile nei campioni dopo refrigerazione e leggermente diminuita in quelli post scongelamento, osservando comunque una buona conservazione del seme diluito con Y confronto ad X. L' integrità delle membrane cellulari ha fornito risultati così variabili che non è stato possibile effettuare una valutazione statistica, ragion per cui sono stati esposti solo con valore descrittivo.

In conclusione, la buona conservabilità del seme epididimale post castrazione ne permette la crioconservazione e rende possibile effettuare la fecondazione artificiale profonda.

## **ABSTRACT**

*The cryoconservation of equine epididymal sperm is important to preserve genetic material obtained from the testes of stallions castrated or dead.*

*This study evaluated the motility and membrane integrity of spermatozoa semen samples taken from the tail of the epididymis of six stallions in four conditions: 1) on fresh semen at 0 hour (F\*A); 2) on fresh semen after 24 hours of refrigeration at +4°C (F\*B); 3) on frozen semen at 0 hour (C\*A); 4) on frozen semen at 24 hours (C\*B). After castration a testicle was diluted with Equipro™ and analyzed immediately, while the contralateral was refrigerated for 24 hours at +4°C before obtaining the seed. Samples were analyzed in two times: a) after the extraction of the seed, upon dilution with two different freezing extenders from being compared (X: Palmer modified and Y: Egg Tech®); b) post thawing. Sperm motility, expressed by the percentage of motile and progressive sperm, was similar in the samples after refrigeration and slightly decreased in those post thawing, observing still a good conservation of the seed diluted with Y in comparison with X. The integrity of cell membranes has provided results so variable that was not possible perform a statistical evaluation, for which reason they were only exposed with descriptive value.*

*In conclusion, the good quality of the epididymal seed post castration allows the cryoconservation and makes it possible to carry out deep artificial insemination.*

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 LA CASTRAZIONE

La castrazione è una tecnica chirurgica che prevede l'asportazione dei testicoli e viene effettuata frequentemente sui cavalli indirizzati alle discipline sportive agonistiche oppure impiegati nel tempo libero. I motivi che portano ad optare per tale intervento generalmente sono legati a: 1) difficoltà di gestione del maschio intero in ambienti in cui sono presenti femmine che naturalmente manifestano comportamenti estrali; 2) problemi caratteriali che lo stallone esprime con aggressività, irruenza, irrequietezza e libido; 3) patologie che colpiscono i testicoli quali degenerazione, orchite ed epididimite, ipoplasia e neoplasie [37].

La castrazione può essere effettuata in clinica così come direttamente sul campo, potendo scegliere fra tre tecniche chirurgiche che prevedono l'orchiectomia a testicolo coperto, a testicolo scoperto (entrambe con il cavallo in decubito laterale ed anestesia generale) e l'intervento con l'animale in stazione quadrupedale (che prevede sedazione ed anestesia locale intratesticolare con lidocaina al 2%).

Se non si presenta la necessità ai fini riproduttivi o il desiderio di mantenere il maschio intero, l'età migliore per effettuare la castrazione è immediatamente dopo la fase della pubertà

del puledro, in modo tale da garantire la completa maturazione sessuale ma non quella caratteriale.

## 1.2 LA PUBERTÀ

La pubertà viene definita dal periodo di transizione compreso dallo stato di immaturità sessuale a quello di piena competenza riproduttiva. Di un animale si dice che ha raggiunto la maturità quando è in grado di rilasciare gameti e di manifestare un comportamento sessuale. Tale comportamento e le caratteristiche del seme nello stallone coincidono approssimativamente con la stagione riproduttiva della femmina, anche se alcuni soggetti manifestano atteggiamenti sessuali durante tutto l'anno [35].

Sono stati effettuati numerosi studi dagli anni Ottanta in poi per stabilire con precisione il periodo dell'inizio della pubertà, ma purtroppo i dati raccolti sono pochi e spesso contrastanti a causa della grande variabilità di detenzione degli equidi che influisce ampiamente su età, peso e periodo dell'anno. Dai lavori di ricercatori come Wesson e Ginther (1981), Palmer e Draincourt (1983), Adams e Bosu (1988), Camillo et al. (2002), Nogueira et al. (1997) e Naden et al. (1990), si è potuto stabilire un *range* fisiologico per l'inizio della pubertà compreso tra 10 e 15 mesi nei pony, 12 e 14 mesi nei Purosangue, 14 e 24 mesi nei Quarter Horse [35].

Una ricerca svolta da Brown-Douglas, Firth, Parkinson e Fennessy (2004) su diversi gruppi di puledri Purosangue allevati in Nuova Zelanda, ha dimostrato che c'è un'importante correlazione tra fotoperiodo, periodo di nascita e

peso corporeo nel determinare l' inizio della pubertà. Nei puledri maschi l' inizio della maturazione sessuale era concomitante con l' aumento della concentrazione ematica di testosterone, rappresentata da un valore soglia pari a 0.05 ng/ml con picchi definiti da valori maggiori di 0.1 ng/ml [35]. L' inizio della pubertà nei puledri nati in autunno avveniva durante la primavera successiva alla nascita e la media delle età dei cavalli nati in primavera ed in autunno erano rispettivamente di 11 e 8 mesi. Questo dato dimostra chiaramente che la stagione di nascita influenza notevolmente l' età della pubertà. In correlazione vi era anche il peso corporeo, pari ad una media di circa 280 kg (il 49% del peso corporeo da adulto). Infine è stato dimostrato che la maturità sessuale viene raggiunta solo durante il periodo primaverile, in quanto la maggior durata delle ore di luce è un fattore fondamentale nell' avvio dello sviluppo sessuale. Nello studio descritto tutti i puledri testati raggiungevano la pubertà nello stesso periodo dell' anno ma presentando significative differenze di età, fattore che conferma che i cambiamenti stagionali legati al fotoperiodo influenzano notevolmente l' inizio della pubertà. È probabile che il cambiamento del fotoperiodo da decrescente a crescente dopo il solstizio d' inverno sia lo stimolo per l' inizio della pubertà [35].

Gli stalloni intorno ai due anni di vita presentano larghezza scrotale totale ridotta e testicoli morbidi, ne consegue il prelievo di campioni di seme apparentemente acquoso, con bassa concentrazione di spermatozoi (20 milioni/ml) di cui la metà sono cellule germinali immature. Le caratteristiche di tale materiale seminale sono tipiche di cavalli che non hanno ancora concluso la pubertà, fattore che viene indicato da una conta totale di 100 milioni di spermatozoi per eiaculato. Il seme di stalloni immaturi è caratterizzato da bassa

concentrazione spermatica, scarsa motilità, elevata percentuale di cellule germinali e difetti anatomici degli spermatozoi [25].

### 1.3 LA MATURAZIONE SPERMATICA EPIDIDIMALE

Dalla coda dell' epididimo dei testicoli post castrazione è possibile estrarre materiale seminale, permettendo di preservare una modesta quantità di materiale genetico.

Gli spermatozoi lasciano la rete testis in uno stato di funzionalità immatura e sono privi di meccanismi di auto difesa [29], diventano motili e pronti per fertilizzare solo dopo la loro discesa e progressiva maturazione all' interno del tubulo epididimale [16, 26].

Durante la spermatogenesi avvengono cambiamenti dinamici nella composizione dei lipidi di membrana, rappresentati soprattutto dall' accumulo di precursori del colesterolo [27] : nella testa e nel corpo avvengono numerose modificazioni biochimiche e metaboliche, mentre la coda deve essere considerata primariamente come sito di stoccaggio degli spermatozoi maturi. Maggior motilità ed attività mitocondriale sono riscontrabili nella coda dell' epididimo [17] mentre l' integrità acrosomiale rimane costante attraverso il dotto epididimale. Contrariamente, la frequenza di spermatozoi motili con membrana mitocondriale intatta è maggiore nella testa [15].

Nel processo della spermatogenesi le cellule replicano e maturano da cellule germinali diploidi denominate spermatogoni, fino a diventare spermatozoi maturi aploidi;

ogni giorno ne vengono prodotti bilioni (16 milioni/gr di tessuto testicolare dello stallone al giorno).

Il periodo di tempo necessario per passare da spermatogone a spermatozoo che entra nel lume dei tubuli seminiferi è stato sperimentalmente dimostrato essere di 57 giorni nello stallone. Durante questo intervallo si osservano tre fasi: a) spermatocitogenesi, della quale fanno parte mitosi e differenziazione degli spermatogoni (19.4 giorni); b) meiosi, periodo della replicazione (primary spermatocytes) e della riduzione del materiale genetico a spermatide aploide (19.4 giorni); c) spermiogenesi, sviluppo e differenziazione (18.6 giorni). La spermiogenesi è il rilascio di spermatozoi nel lume dei tubuli seminiferi.

Approssimativamente sono necessari 9 giorni per il trasporto degli spermatozoi attraverso il sistema del dotto escretore, inoltre ci sono un' influenza stagionale ed un' influenza dell' età sulla produzione totale di seme, sulla motilità e sulla morfologia delle cellule spermatiche [25]. Le modificazioni del seme post gonadico sono maggiormente correlate a motilità, capacitazione e processi di penetrazione [12, 13] dell' oocita. Notevole importanza nel favorire la maturazione spermatica è da attribuire alle proteine epididimali, oltre all' attività dell'epididimo stesso, ed ai componenti del suo fluido luminale [13]. Alcune analisi effettuate sul materiale seminale prelevato dalla coda dell' epididimo hanno rivelato la sua ricchezza in proteine [18] quali piccole GTP-binding [22], proteina Rnase 10 [21], CRES (cystatin-related epididymal spermatogenic), un membro della superfamiglia delle cisteine-proteasi inibitori, che contribuisce alla formazione di amiloide nel lume necessario per il trasporto delle proteine luminali verso la superficie del seme [20], CRISP 1 (cysteine-rich secretory protein) espressa nella regione prossimale dell'

epididimo [19], colesterolo ed albumine sieriche [23] ed infine la prostaglandina D2 sintasi glutatione-indipendente, ritrovata durante uno studio effettuato da Fouchécourt et al. sul seme epididimale dello stallone, della quale però non si conosce precisamente il ruolo [24]. I fattori che conducono alla capacitazione degli spermatozoi, fenomeno per cui la membrana cellulare si modifica e permette alla cellula spermatica di legarsi alla zona pellucida dell' oocita ed innescare la reazione acrosomiale [33], dipendono dalla modulazione delle proteine che agiscono mediante cascate di fosforilazione e de fosforilazione [14].

L' integrità e la maturità del DNA sono i fattori più importanti nella caratterizzazione della qualità del seme che viene valutata attraverso il numero di fertilizzazioni, una buona qualità embrionale e gravidanze che procedono in salute. Altro indicatore utile nel controllo della qualità dello sperma è la via dell' apoptosi durante spermatogenesi e maturazione delle cellule spermatiche [28]. L' infertilità nel maschio è spesso causata dalla scarsa motilità degli spermatozoi con conseguente difficoltà d' interazione con l' oocita, dalla ridotta concentrazione di bicarbonato nel fluido endoluminale e da un PH basso, fattori che rendono le cellule spermatiche quiescenti durante la maturazione e lo stoccaggio in questo organo [30].

## 1.4 REFRIGERAZIONE E CRIOCONSERVAZIONE DI SEME EPIDIDIMALE

Sono stati fatti numerosi studi sull' estrazione, la refrigerazione e la crioconservazione del materiale seminale epididimale per verificarne le capacità fertilizzanti successive ai trattamenti. Tra questi, Papa et al. nel 2008 hanno sperimentato gli effetti della diluizione di tre diversi extender da congelamento sul seme epididimale dopo crioconservazione. Hanno dimostrato la validità del materiale seminale ottenendo 12 gravidanze su 18 inseminazioni avvenute con seme epididimale. Inoltre hanno testato gli effetti della conservazione del seme epididimale prima del congelamento addizionandolo al plasma seminale e ad altri media per la capacitazione, ottenendo risultati sorprendenti poichè i campioni non mostravano alcuna differenza nel plasma, nelle membrane acrosomiali o mitocondriali in nessun gruppo di studio [2]. Papa et al. nel 2011 hanno eseguito un altro importante studio sul congelamento di materiale seminale di stallone, confrontando allo scongelamento la fertilità di campioni di seme eiaculato con quelli di seme epididimale. Questa sperimentazione è stata effettuata esaminando i campioni di sei stalloni il cui seme è stato valutato con tre metodiche differenti: 1) post prelievo con vagina artificiale; 2) dopo estrazione dalla coda dell' epididimo; 3) dopo estrazione dalla coda dell' epididimo e successiva refrigerazione a +5°C per 24 ore. I campioni sono stati analizzati in tre tempi, valutando tramite CASA la motilità del seme fresco, dopo diluizione con extender da congelamento e dopo crioconservazione. La fertilità è stata

provata inseminando 39 cavalle ed ottenendo una media di 9 parti per gruppo di studio. Entrambe le sperimentazioni messe in atto da Papa et al. hanno dimostrato che non si osservano variazioni significative riguardanti motilità e fertilità nel confronto fra seme epididimale e seme eiaculato [1,2,3].

Una recente sperimentazione effettuata in Spagna da Vieira et al. (2012) ha studiato l'effetto della refrigerazione, a +4°C per 96 ore, sui parametri del seme epididimale prelevato da testicoli post castrazione. Gli obiettivi erano di valutare gli effetti sulla motilità di: 1) seme refrigerato; 2) addizionato ad extender da congelamento prima della criopreservazione; 3) allo scongelamento. I risultati ottenuti hanno dimostrato il mantenimento di una buona motilità fino a 72 ore [4].

## **1.5 RUOLO DEL PLASMA SEMINALE**

Il plasma seminale è un fluido complesso che media le funzioni chimiche dell'eiaculato. Le componenti biochimiche sono secrete dalla rete testis, dall'epididimo e dalle ghiandole accessorie del tratto riproduttore maschile [26].

Le proteine del plasma seminale sono coinvolte nel rimodellamento della superficie spermatica, indispensabile durante il transito degli spermatozoi nel tratto genitale prima e nell'eiaculato dopo. È stato dimostrato inoltre che esse contribuiscono nelle fasi iniziali e centrali della fertilizzazione, nello stoccaggio degli spermatozoi nonché

nella modulazione dell' interazione tra capacitazione e gameti [8,5]. Il rimodellamento delle componenti di membrana durante il processo di sviluppo costituisce un sofisticato meccanismo di controllo per garantire che le molecole chiave siano nella posizione corretta della membrana e per un appropriato arco di tempo necessario per mediare alla fertilizzazione [9,10].

Il plasma seminale è composto da ioni, substrati energetici ( glucosio, fruttosio, sorbitolo, glicerilfosfocolina), composti organici ( acido citrico, aminoacidi, peptidi, proteine ad elevato e basso peso molecolare, lipidi, ormoni e citochine) ecc. La sua composizione è determinata dalla dimensione, dalla capacità di stoccaggio e dalla secrezione dei differenti organi del tratto riproduttore maschile.

La funzione del plasma seminale nella normale fisiologia è associata all' eiaculazione degli spermatozoi ed alla loro conseguente sopravvivenza nell' apparato riproduttore femminile. Ricopre inoltre diversi ruoli, tra i quali: 1) attiva ed aumenta la motilità degli spermatozoi; 2) tampona per fornire un ottimale medium nutriente ed osmotico; 3) previene l' attivazione prematura degli spermatozoi durante il trasporto e la stabilizzazione delle membrane del plasma mediante la capacitazione di inibitori; 4) protegge le cellule spermatiche dalla fagocitosi e dalla distruzione durante processi infiammatori; 5) regola il trasporto e l' eliminazione dello sperma; 6) attiva l' espressione delle citochine embriotrofiche ed interviene nella preparazione del tratto materno per lo sviluppo dell' embrione; 9) influenza la fertilità.

Il plasma seminale contiene numerose proteine, molte delle quali sono prodotti di secrezione di epididimo e vescicole seminali. L' aggiunta o la rimozione di una parte delle

proteine durante la maturazione epididimale ed al momento dell' eiaculazione sono fondamentali per mantenere la stabilità della membrana cellulare, la motilità, la capacitazione ed interazione e fertilizzazione spermatozoo-uovo. Le proteine inoltre promuovono il legame e la fagocitosi con gli spermatozoi morti.

Per proteggere le cellule spermatiche dallo stress ossidativo, entrambi spermatozoi e plasma seminale contengono enzimi antiossidanti conosciuti come superossido dismutasi (SOD), glutatione reduttasi (GR), glutatione perossidasi (GPx) con i loro substrati e catalasi (CAT). Sorprendentemente il plasma seminale possiede la maggior concentrazione di antiossidanti di ogni altro fluido biologico, incluso il sangue. Un enzima epididimale simile alla CAT protegge gli spermatozoi dal danno ossidativo all' interno del lume , mentre SOD e GPx secrete dalle vescicole seminali proteggono lo sperma dopo l' eiaculazione. La funzionalità spermatica è altamente dipendente dall' ambiente ionico ed una differenza nel livello minerale alimentare potrebbe avere un' effetto positivo sulla concentrazione di ioni nel plasma seminale. Il fruttosio viene sintetizzato a partire dal glucosio del sangue dalle vescicole seminali, influenzate dall' azione del testosterone; infatti la sua concentrazione tende ad incrementare durante la stagione riproduttiva. Gioca un ruolo importante nel metabolismo poiché gli spermatozoi utilizzano il fruttosio per produrre ATP. La sua concentrazione spesso è usata come un indicatore dello stato degli androgeni di un animale perché la secrezione del fruttosio è strettamente governata dal livello di androgeni sierici.

I lipidi sono una caratteristica chiave della composizione della membrana plasmatica e del plasma seminale e sono indispensabili per la funzionalità spermatica. Specialmente

fosfolipidi e colesterolo hanno un' importante rilevanza nella struttura, nel metabolismo e nella capacitazione degli spermatozoi, nonché nella fertilizzazione dei gameti femminili [26].

Il seme equino è conosciuto per essere particolarmente sensibile alla crioconservazione in termini di qualità di sperma e tasso di gravidanza, ma una ricerca svolta all' università di Bangkok ha dimostrato che addizionando colesterolo ricco in ciclodestrina (CLCs) al seme epididimale di stallone si migliorano sia la sensibilità al raffreddamento che la crioconservabilità [11].

Il plasma seminale è ricco anche di ormoni steroidei e prostaglandine che vengono prodotti dalle cellule di Leydig, dall' epididimo, dalle vescichette seminali e dall' attività della prostata. Le citochine sono importanti fattori per la funzione antiinfiammatoria ed insieme alle prostaglandine vengono trasferite nell' apparato riproduttore femminile al momento dell' inseminazione predisponendo i tessuti dell' utero e della cervice all' impianto del prodotto del concepimento [26]. Il plasma seminale inoltre stimola la motilità progressiva degli spermatozoi nel seme epididimale fresco mentre questo fenomeno risulta meno evidente nei campioni esaminati post scongelamento [6].

Heise et al. (2010-2011) hanno condotto alcuni studi sull' influenza dell' aggiunta del plasma seminale al seme epididimale e ne hanno valutato gli effetti osservando i parametri di motilità, progressione e morfologia sui campioni di materiale fresco e post scongelamento. Nella sperimentazione svolta nel 2010 i ricercatori si erano prefissati di comparare i tassi delle gravidanze, previa inseminazione artificiale convenzionale, ottenute utilizzando seme di stallone, fresco e post scongelamento, prelevato dall'

epididimo ed eiaculato. Quindi 21 fattrici sono state assegnate a *random* a 3 stalloni ed inseminate nei cinque cicli estrali consecutivi usando: 1) seme eiaculato fresco; 2) seme epididimale fresco precedentemente esposto al plasma seminale; 3) seme epididimale fresco non esposto al plasma seminale; 4) seme eiaculato congelato; 5) seme epididimale congelato addizionato al plasma seminale e 6) seme epididimale congelato senza esposizione al plasma seminale. Le gravidanze sono state diagnosticate 14 giorni post inseminazione ed hanno rispettivamente presentato i seguenti risultati: 1) 55.6% per la tesi 1; 2) 75% per la tesi 2; 3) 22.2% per la tesi 3; 4) 38.9% per la tesi 4; 5) 27.8% per la tesi 5 ed infine 6) 6.7% per la tesi 6. Complessivamente i tassi di gravidanza ottenuti dalle inseminazioni con seme epididimale fresco e congelato arricchiti di plasma seminale erano significativamente migliori di quelli ottenuti dai campioni non addizionati con lo stesso [7].

Dallo studio effettuato da Heise et al. nel 2011, simile al precedente, invece è emerso che il plasma seminale stimola la motilità iniziale nel seme epididimale fresco e ne previene le malformazioni cellulari, mentre non vi è differenza sugli spermatozoi progressivamente motili valutati nel seme epididimale allo scongelamento [6]. È quindi possibile affermare che l'aggiunta di plasma seminale al materiale seminale epididimale migliora i parametri di motilità e stabilità delle membrane cellulari, facilitando la sopravvivenza degli spermatozoi dopo l'aggiunta di diluitori da congelamento, mentre non sembra avere alcun effetto sulla percentuale di spermatozoi progressivi [7].

Barrier-Battut et al. (2012) durante un recente studio hanno dimostrato che la rimozione del plasma seminale dal seme di stallone aumenta notevolmente la stabilità delle membrane

degli spermatozoi, sia sul fresco che sul congelato, ma in alcuni casi può influenzare negativamente la qualità delle membrane stesse.

Questo studio ha esaminato l'effetto della centrifugazione, seguita o no dalla rimozione del plasma seminale, sui parametri che indicano la qualità del seme dopo 48 ore a +4°C: motilità, integrità delle membrane plasmatiche, integrità dell'acrosoma e la risposta ad un'induzione farmacologica della reazione acrosomiale. Sono stati testati 66 campioni di seme prelevati da 14 stalloni, inclusi quelli che mostravano un'elevata o una scarsa motilità spermatica post refrigerazione. La centrifugazione senza rimuovere il plasma seminale non ha manifestato effetti sui parametri spermatici, mentre la rimozione non ha avuto effetti sulla motilità, ma una significativa stabilizzazione delle membrane spermatiche, come dimostrato da un'importante risposta agli scambi osmotici ed una ridotta attività dell'acrosoma.

Inoltre, per i medesimi campioni di seme, la risposta all'induzione della reazione acrosomiale era significativamente maggiore con la presenza del plasma seminale in confronto a quelli che ne erano stati sottratti. Si può concludere dicendo che l'unico parametro notevolmente correlato alla fertilità è la motilità [36].

## 1.6 NORMATIVA PER APPROVARE UNO STALLONE

Il seme epididimale può essere prodotto anche in condizioni di emergenza, ma se non sussistono i requisiti sanitari e dei libri genealogici i puledri non saranno iscrivibili agli stessi ma diventeranno produzione comune.

Gli stalloni, per essere adibiti alla monta naturale privata o pubblica ed al prelievo di seme per effettuare l'inseminazione artificiale, devono soddisfare le seguenti condizioni, previste dagli articoli 1 e 4 del DM n° 403 del 19 Luglio 2000:

- a) essere iscritti nella sezione " riproduttori maschi" del libro genealogico o del registro anagrafico delle razze d'appartenenza. L' iscrizione deve essere attestata dal certificato genealogico o anagrafico rilasciato dall' associazione o dall' ente che tiene i suddetti libri o registri
- b) essere identificati in maniera inequivocabile tramite tatuaggio od altro mezzo idoneo stabilito dalle norme del competente libro o registro
- c) disporre, ove previsto nel relativo libro genealogico o registro anagrafico, di un certificato d' accertamento dell' ascendenza, basato sull' analisi del gruppo sanguigno, DNA o altro metodo adeguato, rilasciato dall' ente che tiene il medesimo libro o registro

- d) essere in possesso delle certificazioni sanitarie, rilasciate dall' Azienda ULSS, che attestino i requisiti stabiliti dal Ministero della Salute; tali accertamenti dovranno essere eseguiti nel periodo compreso tra la fine della passata stagione e l' inizio della nuova stagione di monta
- e) essere in possesso di tutti i requisiti richiesti dal libro genealogico o registro anagrafico per l' impiego in riproduzione
- f) nel caso di cavalli di razza Purosangue inglese e Trottatore italiano devono essere iscritti, oltre che al libro genealogico, anche all' apposito repertorio degli stalloni di cui all' articolo 3 comma 3 della legge n° 30/91 [31]

Dopo il primo Gennaio di ogni anno, prima di usare uno stallone per coprire/♂ruffianare/raccogliere seme, bisogna assicurarsi che il certificato di laboratorio che conferma l' assenza di infezioni dello stallone durante la stagione di monta in corso sia reso disponibile ai proprietari/gestori della fattrice.

Il Codice Internazionale di Prevenzione comprende le malattie causate da tre specie di batteri: 1) *TAYLORELLA EQUIGENITALIS*, responsabile della Metrite Equina Contagiosa (CEM), molto frequente nella popolazione non Purosangue ed in piccola parte anche in quella Purosangue dell' Europa continentale. 2) *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, la maggior parte dei tipi di tale batterio non causa malattia, ma i tipi 1, 2 e 5 possono essere trasmessi per via venerea. Quando si diagnostica la presenza di Klebsiella Pneumoniae in un cavallo si dovrebbero eseguire le analisi per determinare il tipo di

batterio coinvolto. 3) *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*, non tutti i tipi di questo batterio provocano una malattia venerea, ma non c'è un metodo attendibile per differenziarli tra loro. Di conseguenza, tutti i tipi che vengono isolati dovrebbero essere considerati potenziali patogeni venerei.

Gli stalloni infetti di solito non mostrano sintomi ma i batteri sono presenti sul loro pene, sulla guaina peniena e, nel caso di *Klebsiella Pneumoniae* e *Pseudomonas Aeruginosa*, in uretra e vescica. Per prevenire l'infezione bisogna: stabilire che ogni riproduttore è esente da infezione prima che inizi l'attività riproduttiva. Il veterinario prende dei tamponi dai genitali degli stalloni per testarli in laboratorio contro l'eventuale presenza di CEM, *Klebsiella Pneumoniae* e *Pseudomonas Aeruginosa*. I tamponi per gli stalloni vanno presi da uretra, fossa uretrale, guaina peniena e, se possibile, dal liquido pre-eiaculatorio e vanno coltivati aerobicamente e microaerofilicamente [32]:

- a) Se i risultati sono negativi, il cavallo può iniziare l'attività riproduttiva; se i risultati sono positivi, il cavallo è infetto e perciò deve essere trattato, ritestato e negativizzato. Durante il trattamento il cavallo non deve essere usato a scopi riproduttivi. Se un tampone è positivo per la CEM, sarà fatta un'indagine sulla fonte e sull'estensione della malattia
- b) controllare che i cavalli non si infettino ed esercitare strette misure igieniche

## 1.7 INTERESSE AL CONGELAMENTO DI MATERIALE SEMINALE EPIDIDIMALE

Il congelamento del seme epididimale può essere molto vantaggioso perché permette di conservare il patrimonio genetico di un riproduttore stoccando a basso costo in azoto liquido una decina di aliquote per stallone. Questa evenienza rende più accessibile a chiunque la possibilità di dare vita ad un puledro senza dovere necessariamente mantenere intero il maschio riproduttore, facilitando notevolmente la gestione del cavallo stesso oltre a favorire il contenimento dei costi economici. Infatti avendo la possibilità di prelevare il seme post castrazione ed inviarlo entro 24 ore ad un laboratorio specializzato per la preparazione del materiale seminale al congelamento, il settore della riproduzione può aprire le porte ad una clientela più ampia, non più rappresentata solo dai grandi allevatori ma anche dai privati che desiderano conservare alcune dosi di materiale seminale per fecondare un ridotto numero di cavalle.

Sovente ci si trova di fronte a realtà gestionali piuttosto difficili dettate dall' ingestibilità di alcuni soggetti che manifestano carattere troppo esuberante o addirittura aggressivo, divenendo quindi pericolosi per gli operatori e per i quali è senza dubbio consigliata la castrazione con il fine di placarne l' irascibilità. Potrebbe essere importante quindi conservare qualche aliquota di seme epididimale di soggetti appartenenti a prestigiose linee genealogiche ma che

manifestano pessimo comportamento, oppure di cavalli atleti che durante gli impegni agonistici non riescono a mantenere la concentrazione a causa della forte influenza ormonale, o ancora di ottimi riproduttori che subiscono morte improvvisa a seguito di grave trauma o patologia acuta.

In altre situazioni la variabile più significativa che porta alla raccolta e conservazione di seme epididimale è la difficoltà economica che comporta il mantenimento di uno stallone di genealogia, soprattutto se l'animale è giovane e necessita di un apposito addestramento al manichino effettuato da persone qualificate per effettuare i prelievi di seme, poiché deve essere stabulato in centri specializzati, allevamenti o stazioni di monta, almeno durante tutta la stagione riproduttiva e deve essere sottoposto a tutti i controlli sanitari richiesti all'inizio di ogni stagione di monta con importanti costi economici.

Mediante questa tecnica innovativa di conservazione del patrimonio genetico si può facilitare anche l'organizzazione delle metodiche di prelievo, potendo inviare tramite corriere i testicoli al laboratorio, invece di dover trasportare lo stallone in una stazione di monta autorizzata come prevede invece il *management* della riproduzione classica.

Congelare materiale seminale post castrazione sarebbe di notevole aiuto per tutti coloro che desiderano mantenere un patrimonio genetico senza i gravosi oneri che dipendono dal mantenimento di uno stallone riproduttore approvato oppure in caso di morte improvvisa del soggetto.

## 2 OBIETTIVI

L'obiettivo del lavoro è di valutare se vi sia un' adeguata qualità del materiale seminale in campioni di seme epididimale prelevato post castrazione, tali da consentirne le procedure di congelamento. Le valutazioni vengono fatte su seme estratto da epididimi freschi e refrigerati a +4°C per 24 ore post scongelamento, ponendo la massima importanza alle percentuali di motilità, spermatozoi progressivi ed integrità delle membrane cellulari valutate sia prima che dopo le procedure di congelamento.

La sperimentazione vuole inoltre confrontare l' effetto di due diversi extenders (Palmer modificato ed Egg Tech®) sia prima che dopo il congelamento del materiale spermatico epididimale con lo scopo di ottimizzare la produttività.

## 3 MATERIALI e METODI

Per lo svolgimento della sperimentazione è stato utilizzato il seme epididimale di 6 stalloni di differenti razze ed età post castrazione, di proprietà privata.

Il lavoro è stato svolto presso la stazione di monta LC STALLONI di Vigonza (PD).

### 3.1 DISEGNO SPERIMENTALE

I testicoli di 6 stalloni sono stati separati in due gruppi di tesi: i primi sono stati processati immediatamente post castrazione (A) mentre quelli del secondo gruppo sono stati refrigerati a + 4°C per 24 ore e poi lavorati (B).

Per ogni testicolo sono state valutate la percentuale di motilità e di spermatozoi progressivi, sia sul seme fresco (F) tal quale, che sul materiale seminale addizionato con due extender messi a confronto (C). I medium da congelamento testati sono il Palmer modificato (X) e l'Egg Tech® (Y).

### 3.2 MATERIALI

- EquiPro™ (Minitüb): è un mezzo di coltura per la conservazione del materiale seminale equino adatto anche come diluente per la centrifugazione (Fig.1)



*Fig. 1. Diluente EquiPro™*

- Extender Palmer Modificato: crioprotettore da congelamento composto da latte scremato, glicerolo al 4% e tuorlo d'uovo al 4%
- Extender Egg Tech®: preparato per il congelamento del seme equino prodotto in Gran Bretagna dalla TECHNOLOGIES INTERNATIONAL Ltd, product n° DMO+30, cryo DMO+freezing, BATCH n° 0731104, volume 30 ml, store at -20°C or below
- Provette di plastica con tappo giallo
- Set di piastre in plastica trasparente
- Vetrini semplici per la lettura al microscopio ottico dell'integrità di membrana degli spermatozoi
- Colorante Eosina Nigrosina
- Vetrini Cell-Vü: per la valutazione di %MOT e %PMS

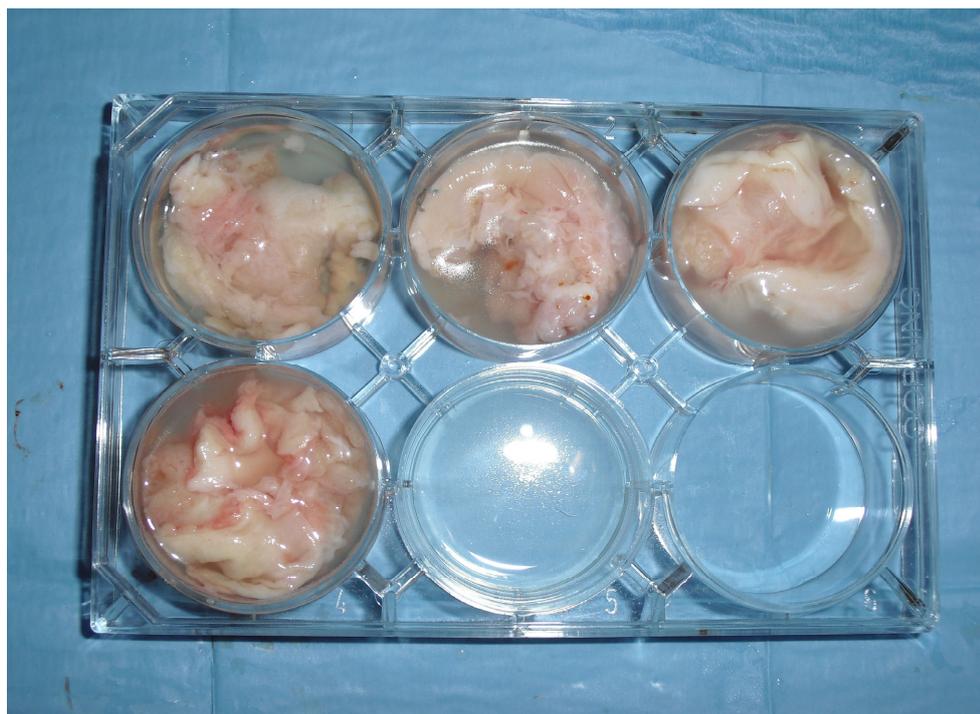
- Hamilton Thorne Biosciences: per l'analisi computerizzata del seme (CASA)
- Paillettes da congelamento di diversi colori
- Micropipettatrice per prelevare il seme dalle piastre
- Contenitori Eppendorf
- Bidone di azoto liquido per il congelamento
- Soluzione fisiologica e contenitori di plastica con coperchio: per trasportare i testicoli al laboratorio post castrazione

### 3.3 METODI

Ogni campione contiene quattro codici: a) n° stallone; b) tesi: testicolo A (a 0 ore) e B (a 24 ore); c) extender: X (Palmer modificato) e Y (Egg Tech®); stato del seme: F (fresco) e C (congelato).

Dopo castrazione i testicoli sono stati immersi in contenitori di plastica dotati di coperchio e riempiti con soluzione fisiologica , necessaria per impedirne il deterioramento, per essere trasportati al laboratorio.

Da ogni testicolo è stata tagliata la coda dell'epididimo sulla quale è stato effettuato uno slicing manuale a raggiera per estrarne il seme successivamente depositato in piastre trasparenti ( Fig.2).



*Fig. 2 Slicing manuale delle code di epididimo*

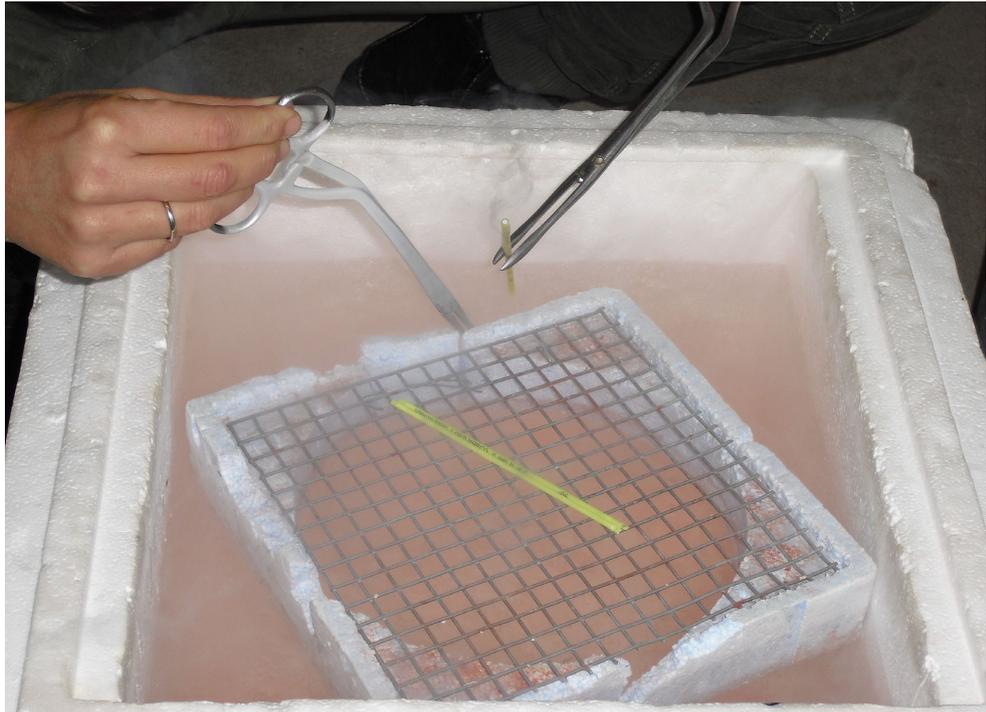
Il campione è stato diluito con 5 ml di EquiPro™, precedentemente riscaldato a 37°C, poi ne è stata prelevata una goccia con micropipettatrice, depositata su vetrino Cell-Vü riscaldato ed analizzata tramite il dispositivo computerizzato CASA (computerized assisted sperm analyzer) della Hamilton Thorne Biosciences.

I parametri misurati dallo strumento e considerati per la sperimentazione sono stati: motilità (%MOT) e spermatozoi progressivamente motili (%PMS). Il settaggio utilizzato era quello standardizzato per l'analisi del materiale seminale equino. Le misurazioni sono state effettuate sia sul seme fresco tal quale che sul seme diluito con extender da congelamento, dopo crioconservazione. Per ogni campione sono state effettuate tre valutazioni, una sul seme fresco (

tesi F) e due post congelamento (tesi X e Y) ; inoltre sono state fatte due valutazioni sull' integrità delle membrane cellulari per stabilire la sopravvivenza degli spermatozoi tramite osservazione al microscopio ottico. Per preparare i vetrini venivano poste una goccia di seme (14 µl) ed una goccia di colorante (14 µl) Eosina Nigrosina, successivamente osservate al microscopio ottico con ingrandimento 10X. Di ogni campione venivano analizzati tre campi, contando cento spermatozoi per campo e poi veniva calcolata la media delle tre conte. I campi venivano selezionati manualmente cercando di evitare quelli che presentavano bolle d'aria o impurità.

Per congelare i campioni di seme epididimale sono state effettuate delle diluizioni (2ml di seme e 2ml di extender) con due diversi medium da congelamento: Palmer modificato (X) e Egg Tech® (Y); per ogni campione sono state caricate due paillettes da congelamento sia per il testicolo A che B.

Per consentire l' equilibratura del materiale seminale, le paillettes sono state refrigerate a +4°C per trenta minuti, poi esposte ai vapori dell' azoto liquido per quindici minuti ed infine immerse in esso ( Fig. 3).



*Fig. 3 Congelamento del materiale seminale*

Per lo scongelamento le paillettes sono state tuffate in acqua a 37°C per tre minuti e poi aperte depositando il materiale seminale in eppendorf. Infine sono stati rivalutati i campioni utilizzando gli stessi parametri precedentemente descritti.

Per l'elaborazione delle analisi statistiche è stato utilizzato un modello lineare misto di tipo gerarchico per dati ripetuti nel tempo mediante la PROC MIXED del SAS.

## 4 RISULTATI e DISCUSSIONE

### 4.1 ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata elaborando i dati attraverso l'utilizzo di un modello lineare misto di tipo gerarchico per dati ripetuti nel tempo mediante la PROC MIXED del SAS. Il modello ha considerato, oltre all'effetto fisso della tesi (tipo di extender: X vs Y), del tipo di analisi (sul seme epididimale fresco o congelato) e della loro interazione, l'effetto casuale dello stallone entro tesi x analisi, usato come linea di errore per i precedenti effetti, nonché l'effetto inerente il tempo di analisi (0, 24 ore) e le interazioni tesi x tempo, analisi x tempo e tesi x analisi x tempo. A livello delle interazioni tesi x analisi, tesi x tempo e tesi x analisi x tempo, sono stati realizzati dei contrasti mirati a identificare la significatività dei seguenti confronti:

1. Tra le tesi (X vs. Y) entro analisi effettuata su seme fresco;
2. Tra le tesi (X vs. Y) entro analisi effettuata su seme congelato;
3. Tra le tesi (X vs. Y) entro tempo di analisi a 0 ore;
4. Tra le tesi (X vs. Y) entro tempo di analisi a 24 ore;
5. Tra le tesi (X vs. Y) entro analisi effettuata su seme fresco e tempo di analisi a 0 ore;
6. Tra le tesi (X vs. Y) entro analisi effettuata su seme fresco e tempo di analisi a 24 ore;
7. Tra le tesi (X vs. Y) entro analisi effettuata su seme congelato e tempo di analisi a 0 ore;
8. Tra le tesi (X vs. Y) entro analisi effettuata su seme congelato e tempo di analisi a 24 ore.

## 4.2 ANALISI DELLA VARIANZA

Effetto	MOT%		%PMS	
	F	Pr>F	F	Pr>F
TESI	0.24	0.63	3.23	0.09
ANALISI	4.31	0.05*	5.73	0.03*
TESI*ANALISI	1.37	0.26	0.65	0.43
TESTICOLO	0.43	0.52	3.69	0.07
TESI*TESTICOLO	0.04	0.85	2.61	0.12
ANALISI*TESTICOLO	1.52	0.23	1.88	0.19
TESI*ANALISI*TESTICOLO	0.81	0.38	0.11	0.74

*Tab. 1: Analisi della Varianza sulla motilità percentuale (MOT%) e sulla percentuale di spermatozoi progressivamente motili (%PMS)*

Nella tabella 1 si osserva l'analisi della varianza sulla motilità percentuale (MOT %) e sulla percentuale di spermatozoi progressivamente motili (% PMS), valutando i singoli effetti e le loro interazioni.

Si può notare una variazione discreta, evidenziata dall'asterisco, riguardante l'analisi (F vs C = 0.05) della percentuale dei MOT tra il testicolo A (0h) ed il testicolo B (24h), che mostra un lieve peggioramento della motilità nel seme post scongelamento, ma più significativo è il valore riferito alla percentuale dei PMS che hanno risentito negativamente del congelamento (F vs C = 0.03) come normalmente avviene nel congelamento di materiale seminale eiaculato. Tra i due extender utilizzati il Palmer modificato ha prodotto un' inferiore tasso di sopravvivenza degli spermatozoi rispetto all'Egg Tech®, manifestato dal peggioramento della % di PMS

sia in A che in B che nell' interazione X vs Y su F e B. Nonostante i parametri indicati, si può vedere come generalmente i valori dei fattori presi in considerazione non abbiano subito significative variazioni. I dati in questo lavoro, % MOT e % PMS, hanno risentito entrambi positivamente dell' effetto della tesi Y e dell' analisi F; infatti presentavano valori migliori rispetto alla tesi X ed all' analisi C e questo *trend* si è mantenuto costante per tutta la durata dell' osservazione. I dati più interessanti sono rappresentati dall' interazione tra tesi Y \* analisi C, che evidenzia il mantenimento della motilità degli spermatozoi allo scongelamento (% MOT = 0.26 e % PMS = 0.43).

### 4.3 ANALISI DEI CONTRASTI

CONTRASTI	MOT%		%PMS	
	F	Pr>F	F	Pr>F
x vs y su FRESCO	1.37	0.26	3.39	0.08
x vs y su CONGELATO	0.23	0.63	0.49	0.49
x vs y su a (0)	0.06	0.80	5.34	0.03*
x vs y su b (24)	0.25	0.62	0.90	0.35
x vs y su FRESCO e A(0)	0.35	0.56	1.19	0.29
x vs y su FRESCO e B(24)	1.49	0.24	5.07	0.04*
x vs y su CONGELATO e A(0)	0.01	0.91	0.06	0.80
x vs y su CONGELATO e B(24)	0.75	0.40	1.03	0.32

*Tab.2: contrasti sulla motilità percentuale (MOT %) e sulla percentuale di spermatozoi progressivamente motili (% PMS)*

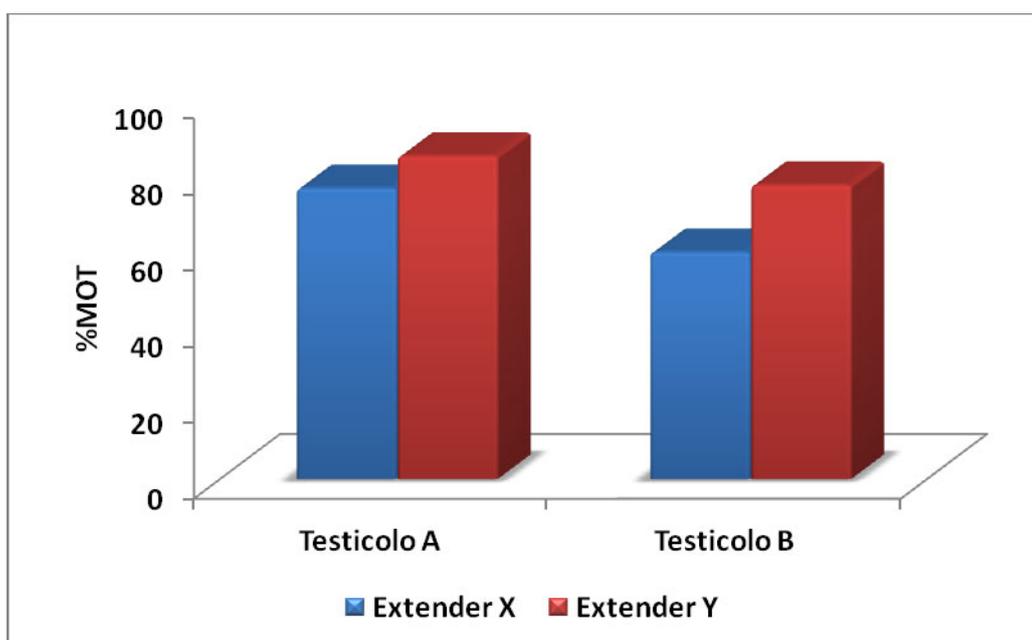
Nella tabella 2 sono riportati i contrasti dei valori medi di ogni parametro e delle loro interazioni, calcolati per ridurre al minimo l'errore statistico. Nelle 48 osservazioni effettuate, considerando le percentuali di MOT e PMS, sono state osservate alcune variazioni significative che mettono a confronto principalmente le tesi (X vs Y). I risultati che hanno inciso positivamente su questo studio sono stati ottenuti dalla tesi Y, rivelando una buona conservabilità dei MOT sia nell'interazione tra le tesi (X vs Y) entro analisi effettuate su seme congelato ( $Pr > F = 0.63$ ), che tra le tesi (X vs Y) entro analisi effettuate su seme congelato e tempo di analisi a 0 ore ( $Pr > F = 0.91$ ). Nella tabella 2 sono da evidenziare anche i risultati positivi ottenuti sulla percentuale dei PMS. Infatti nelle interazioni tra le tesi (X vs Y) entro tempo di analisi a 0 ore e tra le tesi (X vs Y) entro analisi effettuate su seme fresco e tempo di analisi 24 ore, si possono osservare rispettivamente i valori di  $Pr > F = 0.03$  (X vs Y su A) e  $Pr > F = 0.04$  (X vs Y su F e B). Questi risultati suggeriscono che la diluizione del seme epididimale con l'extender da congelamento Egg Tech® (Y) ne rallenta il decadimento cui va incontro normalmente, migliorandone le prestazioni ed aumentandone la probabilità di fecondazione dell'oocita.

#### **4.4 ANALISI DEI PARAMETRI SU SEME FRESCO**

La motilità di cui è dotato lo spermatozoo è un prerequisito fondamentale per la fecondazione, ma per riuscirci non solo deve avere velocità ed un tipo di movimento adatto, deve anche essere in grado di eludere le difese immunitarie femminili, di utilizzare le sostanze nutritive presenti nell'ambiente circostante, di reagire a

stimoli chemioattrattivi prodotti dall' oocita e di penetrarne la zona pellucida per legarsi alla membrana cellulare [33].

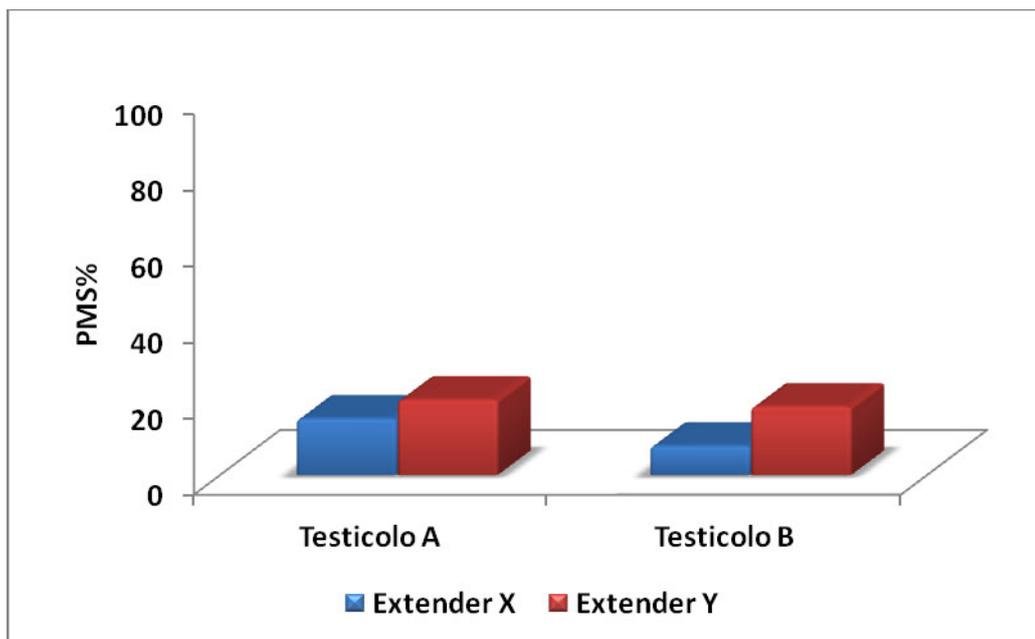
Per mantenere al meglio quindi la qualità del seme fresco è stato indispensabile diluire i campioni con il prodotto commerciale *EquiPro*<sup>TM</sup> (Minitüb), un mezzo di cultura per la conservazione del materiale seminale equino costituito da caseinati, derivanti da diverse frazioni della caseina del latte, zuccheri, sostanze tampone e gentamicina [34]. Questa metodica è stata messa in atto in entrambe le analisi effettuate sul seme epididimale fresco, successivamente addizionato con gli extender X e Y per preparare i campioni al congelamento, entro tempo di analisi a 0 ore e a 24 ore. Nella seguente figura sono riportati i valori di % MOT calcolati su seme fresco.



*Grafico 1. Motilità percentuale (MOT %) nei due tempi (Testicolo A e B) e per i due diversi extender testati (X e Y) su seme fresco*

Dal Grafico 1 emergono dati importanti indicativi della sopravvivenza degli spermatozoi motili in tutte quattro le variabili considerate, con un notevole 85% nell' interazione Y\*F\*A ed un valore pari al 77% nell' interazione Y\*F\*B, mentre nelle interazioni X\*F\*A ed X\*F\*B si notano rispettivamente il 76.5% ed il 59.66% di MOT. Tali osservazioni evidenziano l' importanza dell' utilizzo di un buon medium per preparare il seme al congelamento. Nei campioni di F si osserva anche una buona conservabilità del materiale seminale con l' aggiunta di X, soprattutto nelle analisi fatte a ore 0.

Nel Grafico 2 invece si vogliono confrontare gli effetti degli extender da congelamento sulle percentuali degli spermatozoi progressivamente motili.



*Grafico 2. Percentuale di spermatozoi progressivamente motili (%PMS) nei due tempi (Testicolo A e B) e per i due diversi extender testati (X e Y) sul seme fresco*

Diventa immediatamente evidente il brusco calo della sopravvivenza dei PMS rispetto alla percentuale dei MOT. Nonostante il netto abbattimento dei valori, si può ancora osservare come sia qualitativamente migliore il seme diluito con Y rispetto ad X, dato rappresentato dal 19.83% nell' interazione Y\*F\*A contro il 14.83% di X\*F\*A e dal 18% nell' interazione Y\*F\*B rispetto al 7.66% di Y\*F\*B. Queste valutazioni riconfermano come migliore medium da congelamento Egg Tech® rispetto al Palmer modificato, assicurando una maggior sopravvivenza sia dei MOT che dei PMS sul seme fresco.

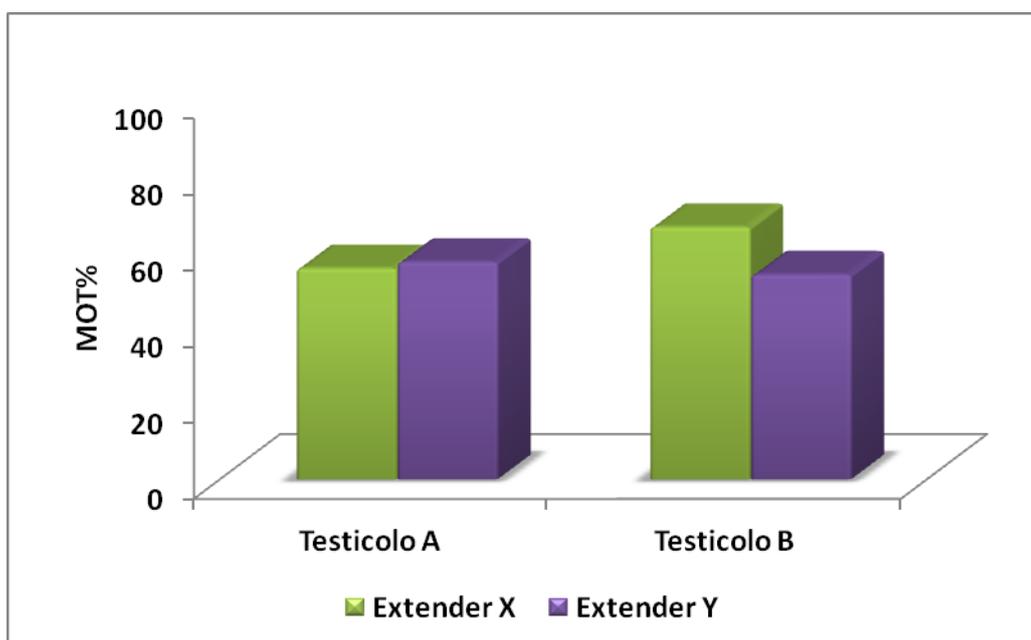
Le statistiche effettuate sui parametri di % MOT e % PMS sono molto importanti dal punto di vista pratico perché rendono reale la possibilità dei medici veterinari liberi professionisti, che la maggior parte delle volte si trovano costretti ad effettuare l'intervento di orchietomia sul campo, di spedire o consegnare i testicoli al centro di riferimento per la produzione di materiale congelato. Infatti con la refrigerazione dei testicoli per 24 ore si osserva una diminuzione poco significativa dei MOT e dei PMS, sia nel seme diluito con X che in quello diluito con Y, quest' ultimo migliore. Valutando l'extender X si nota una perdita di MOT del 16.84% dopo 24 ore, mentre per l' extender Y la perdita è stata solo dell' 8%. Anche i PMS hanno subito un lieve calo delle percentuali conseguente alla refrigerazione dei testicoli a + 4°C, pari al 7.17% con diluizione di X e del 1.83% con Y.

#### **4.5 ANALISI DEI PARAMETRI SU SEME CONGELATO**

Le medesime analisi statistiche precedentemente spiegate sono state effettuate anche sul materiale seminale allo scongelamento per poter

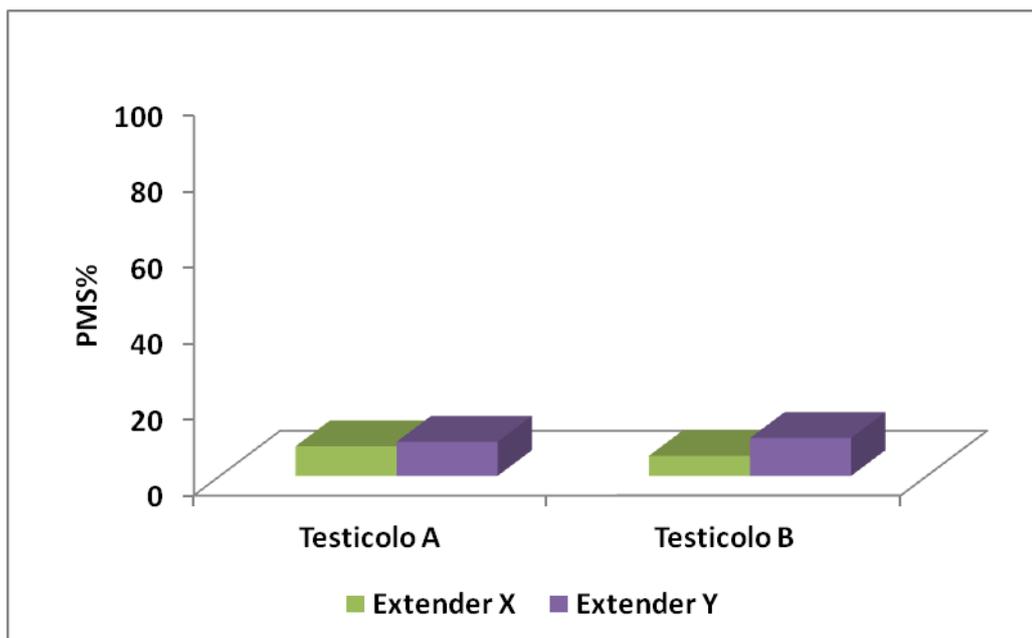
valutare la perdita della % MOT e della % PMS e quindi valutare la qualità del seme epididimale.

Nel grafico 3 sono riportate le medie della % di MOT calcolate nei due tempi, testicolo A e B, rappresentate dal 55.5% nel seme diluito con X e dal 57.17% in quello diluito con Y, ponendo nuovamente in luce la migliore efficacia del medium da congelamento Egg Tech®. Nel confronto con le analisi effettuate sui campioni di B si nota un aumento del 10.83% di motili nel materiale seminale arricchito con X rivelando performance migliori dell' Egg Tech® sui testicoli lavorati dopo 24 ore di refrigerazione. Di particolare interesse invece risulta essere la % MOT osservata nei campioni di B diluiti con Y, perché presentano una perdita pari al 3.34%, valore indice di un seme ancora qualitativamente molto buono.



*Grafico 3. Motilità percentuale (MOT%) nei due tempi (Testicolo A e B) e per i due diversi extender testati (X e Y) su seme congelato*

I calcoli effettuati per valutare l' andamento dei PMS sui campioni post scongelamento hanno rivelato una perdita della percentuale pari al 2.5% per il seme arricchito con X, mentre si osserva un lieve aumento dell' 1% per quello addizionato con Y.



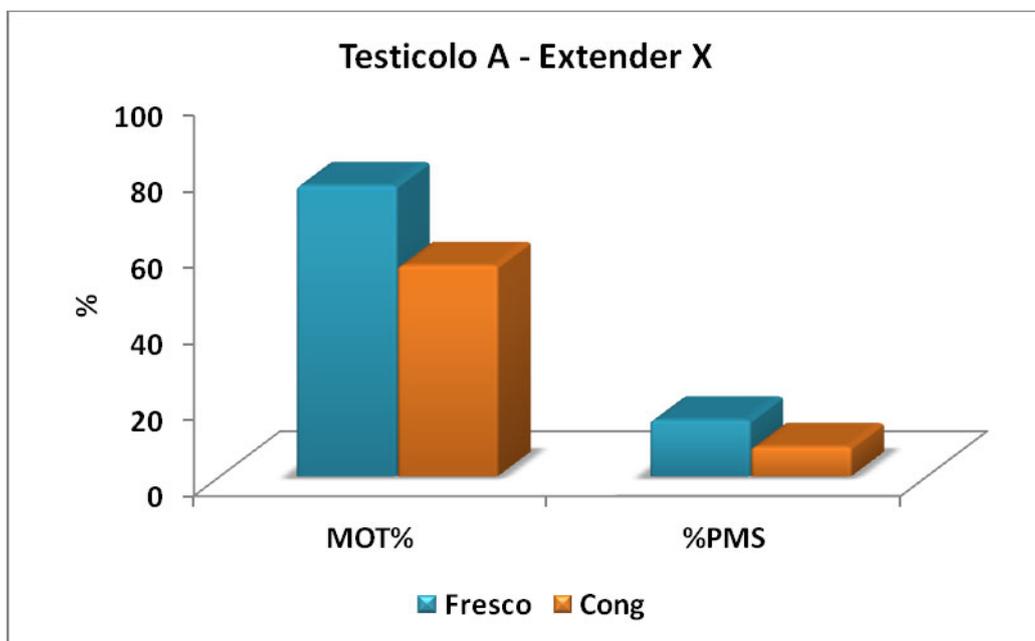
*Grafico 4. Percentuale di spermatozoi progressivamente motili (%PMS) nei due tempi (Testicolo A e B) e per i due diversi extender testati (X e Y) sul seme congelato*

Il trattamento del seme epididimale con Egg Tech® porta a valori di % MOT e % PMS migliori rispetto alla diluizione con l' extender Palmer modificato, differenza osservata soprattutto nei campioni in B, sul seme fresco e post scongelamento (Grafico 4). Questo risultato ha importanti ripercussioni a livello pratico perché considera il congelamento di materiale seminale post castrazione come valida alternativa alle tecniche classiche di prelievo di seme eiaculato,

permettendo lo stoccaggio di piccole dosi di sperma e la conservazione di materiale genetico.

#### 4.6 CONFRONTO FRA EXTENDER DA CONGELAMENTO

Nei seguenti grafici sono stati schematizzati gli effetti degli extender sulle percentuali dei MOT e dei PMS confrontando i valori sul seme fresco e allo scongelamento (Grafico 5).

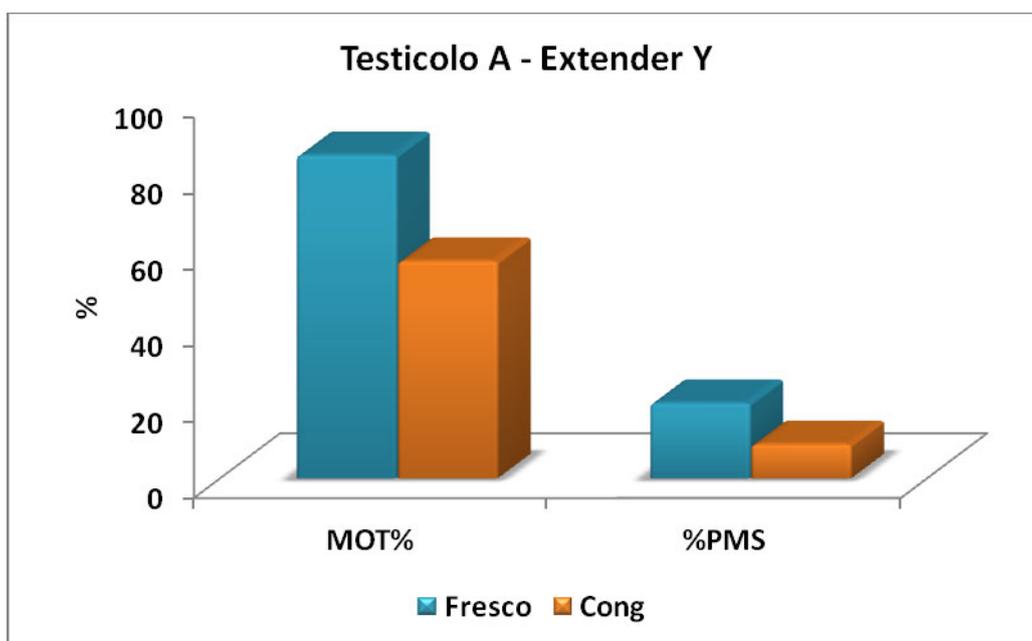


*Grafico 5. Confronto dell' effetto di X sul seme fresco e congelato nel testicolo A*

Nel Grafico 5 sono stati calcolati gli effetti dell' interazione X\*A, che si esprimono con valori pari a 76.5% di MOT sul fresco e di 55.5% sul congelato, indicando quindi una perdita di spermatozoi

motili del 21% . I PMS invece mostrano un calo della percentuale proporzionalmente inferiore rispetto ai MOT, essendo questa solo del 7%.

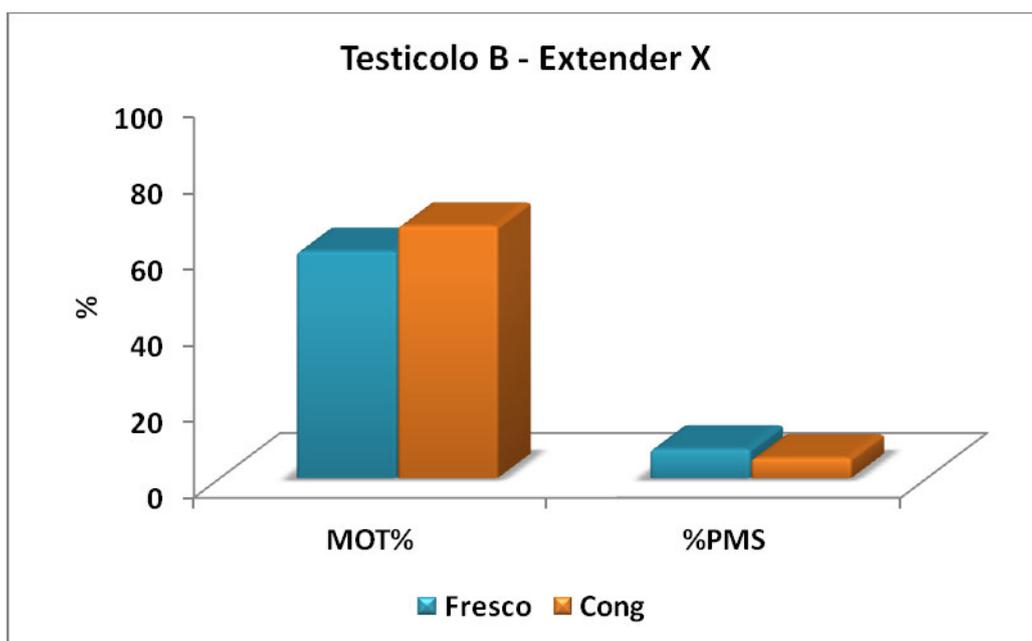
Gli effetti dell' extender Y, illustrati nel Grafico 6, evidenziano l' 85% dei MOT sul seme fresco con perdita complessiva del 27.83% osservata nel post scongelamento. Questo decremento è statisticamente meno significativo di quello preso in considerazione nella precedente figura, perché la percentuale totale dei MOT nei campioni diluiti con Y rimane del 57.17% contro il 55.5% di quelli diluiti con X.



*Grafico 6. Confronto dell' effetto di Y sul seme fresco e congelato nel testicolo A*

Gli effetti dell' extender Y, illustrati nel Grafico 6, evidenziano l' 85% dei MOT sul seme fresco con perdita complessiva del 27.83%

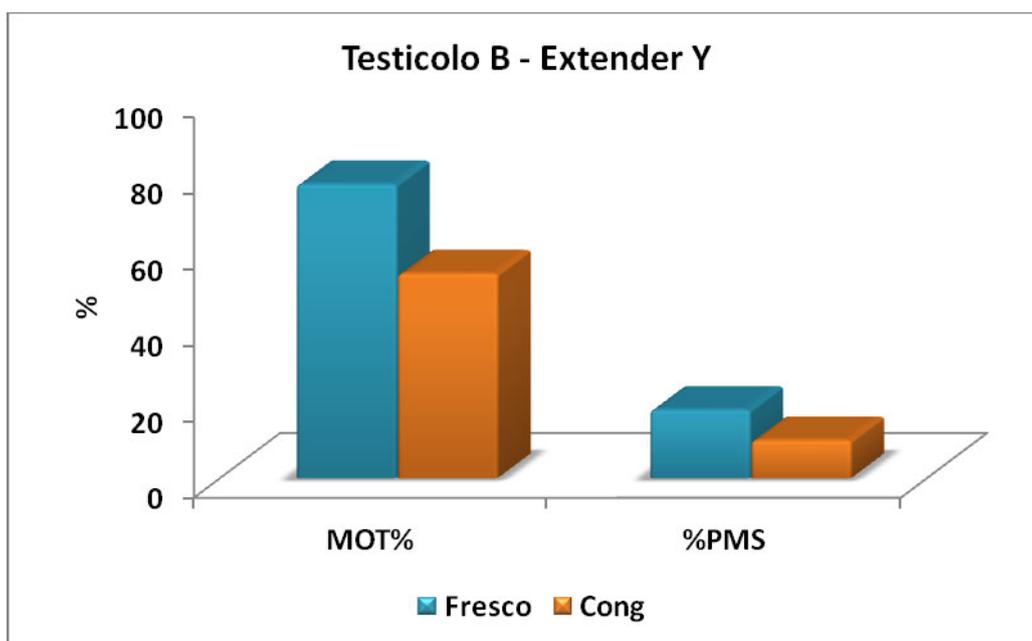
osservata nel post scongelamento. Questo decremento è statisticamente meno significativo di quello preso in considerazione nel precedente Grafico, perché la percentuale totale dei MOT nei campioni diluiti con Y rimane del 57.17% contro il 55.5% di quelli diluiti con X.



*Grafico 7. Confronto dell' effetto di X sul seme fresco e congelato nel testicolo B*

La % MOT rappresentata nel Grafico 7 viene espressa da un sorprendente 66.33% nel seme diluito con X nel post scongelamento contro il 59.66% del fresco, indicando quindi un incremento del 6.67% che statisticamente però non rileva particolare interesse perché si presenta isolatamente e non viene rafforzato da alcun parametro ripetibile. La % PMS raggiunge il valore minimo del 5.33% allo scongelamento manifestando un passivo del 2.33% rispetto al fresco.

Nel Grafico 8 vengono messi a confronto gli effetti dell' extender Y sul testicolo B nelle analisi F e C. La MOT viene espressa dal 77.33% sul fresco con un calo del 23.5% nel post scongelamento mentre la PMS ha una perdita solo dell' 8% allo scongelamento, mantenendo quindi buoni i valori del seme.



*Grafico 8. Confronto dell' effetto di Y sul seme fresco e congelato nel testicolo B*

#### 4.7 ANALISI DELL' INTEGRITÀ DELLE MEMBRANE CELLULARI

Durante la sperimentazione i campioni di seme epididimale prelevato dai testicoli post castrazione sono stati analizzati sia tramite dispositivo computerizzato CASA (computerized assisted sperm analyzer) della HAMILTON THORNE BIOSCIENCES, che mediante la preparazione di vetrini colorati con Eosina Nigrosina. Tale studio voleva mettere in evidenza l'integrità delle membrane degli spermatozoi. Le membrane danneggiate permettono la penetrazione del colorante al loro interno conferendo una sfumatura rosata agli spermatozoi.

E' stato interessante osservare che le percentuali degli spermatozoi positivi al colorante erano inversamente proporzionali alle dimensioni testicolari.

Analizzando lo sperma si è inoltre constatato che gli stalloni di età inferiore ai due anni fossero impuberi o peripuberi, dato confermato dalla presenza nel materiale seminale di cellule spermatiche immature e di concentrazioni inferiori rispetto ai campioni prelevati da stalloni maturi. Ai fini della sperimentazione pertanto tali soggetti sono stati scartati.

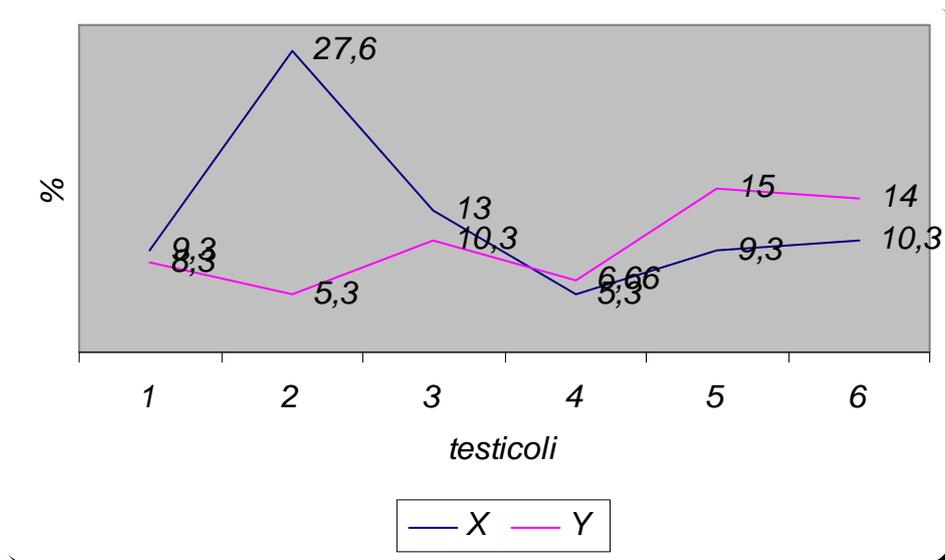
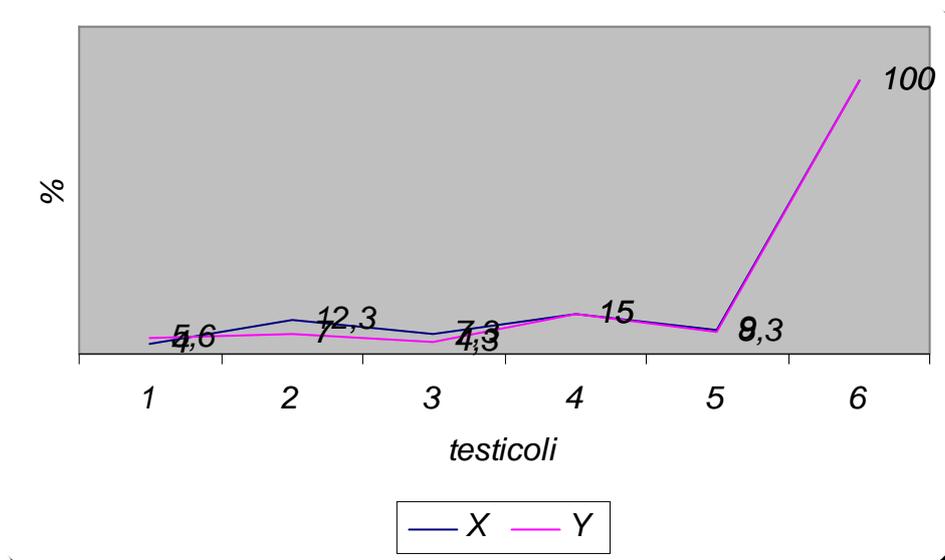


Grafico 9. % spermatozoi positivi al colorante osservate nel testicolo A e per i due diversi extender (X e Y)

Il grafico 9 vuole mostrare la variabilità soggettiva delle risposte delle membrane all' esposizione col colorante Eosina Nigrosina nel testicolo A post scongelamento.



*Grafico 10. % spermatozoi positivi al colorante nel testicolo B e per i due diversi extender (X e Y)*

Dopo 24 ore di refrigerazione si osserva un notevole decremento della sopravvivenza degli spermatozoi nel post scongelamento tra i testicoli A e B per entrambi gli extender, ma spicca il 100% di mortalità nel campione n°6 presente sia nella tesi X che nella Y. In questo caso isolato le membrane spermatiche non hanno sopportato la refrigerazione per 24 ore e la successiva crioconservazione.



## 5 CONCLUSIONI

Al termine delle analisi effettuate si può concludere constatando che il seme epididimale può essere considerato una valida alternativa al seme eiaculato da utilizzare in piccoli allevamenti privati o dai singoli proprietari che desiderano un discendente dal proprio stallone permettendo così la riproduzione di soggetti che, per motivi caratteriali, di management o fisici, devono essere castrati. Mediante il materiale seminale ottenuto da un testicolo si possono stoccare in azoto liquido una decina di paillettes, permettendo di ridurre i notevoli costi che comporta la gestione di uno stallone riproduttore oltre al risparmio di tempo per addestrarlo alla monta sul manichino; inoltre il seme epididimale può essere ampiamente utilizzato nelle *ART* (assisted reproductive technologies).

La refrigerazione dei testicoli a + 4°C per 24 ore ha fornito buoni risultati dimostrando che è possibile effettuare le procedure di lavorazione del seme epididimale anche a 24 ore dalla castrazione, cosa che permetterebbe l'invio mediante corriere dei testicoli post intervento presso centri autorizzati alla produzione di materiale seminale congelato. Vantaggi significativi sono rappresentati dalla conservazione di materiale genetico di stalloni che hanno subito gravi lesioni, patologie importanti o che addirittura sono morti, nonché la possibilità per ogni proprietario di dare vita ad alcuni puledri senza dover mantenere il maschio intero con tutte le difficoltà gestionali che lo caratterizzano. Gli svantaggi sono invece legati alla limitata quantità di dosi che è possibile produrre partendo dai testicoli post castrazione, fattore che impedisce una vera e

propria commercializzazione del materiale seminale qual' ora il soggetto riveli qualità sportive di eccellenza.

Il confronto degli extenders ha dimostrato che quello più valido per la crioconservazione del seme epididimale è senza dubbio l' EGG TECH®, di produzione britannica, che ha mantenuto valori percentuali di MOT e PMS elevati, limitando quindi la perdita qualitativa del seme allo scongelamento anche sui campioni preparati dopo 24 ore di refrigerazione. I dati relativi all'integrità delle membrane degli spermatozoi hanno evidenziato un netto peggioramento dei campioni del testicolo B, dopo 24 ore dal prelievo.

Di notevole importanza è senza dubbio l'età dello stallone: si sono osservati risultati importanti riferiti a motilità e percentuale di spermatozoi progressivi nel seme di cavalli maturi; nei maschi giovani tra due e tre anni i parametri presi in considerazione si sono rivelati molto soggettivi e con notevole variabilità, mentre nei soggetti di età inferiore ai due anni le caratteristiche del materiale seminale epididimale erano talmente di scarsa qualità da portare all'esclusione di tali cavalli dalla sperimentazione.

## 6 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

[1] Bruemmer JE, 2006 « **Collection and freezing of epididymal stallion sperm** » Vet Clin North Am Pract.; 22(3):677-82

[2] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'Acqua JA Jr, Zahn FS, Alvarenga Ma, 2008 « **Freezing of stallion epididymal sperm** » Anim Reprod Sci; 107(3-4):293-301

[3] Monteiro GA, Papa FO, Zahn FS, Dell'Acqua JA Jr, Melo CM, Maziero RR, Avanzi Br, Alvarenga MA, Guasti PN, 2011 « **Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm** » Anim Reprod Sci; 127(3-4):197-201. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.08.002 Epub 2011 Aug 16

[4] Vieira LA, Gadea J, Garcia-Vázquez FA, Avilés-López K, Matás C, 2013 « **Equine spermatozoa stored in the epididymis for up to 96h at 4°C can be successfully cryopreserved and maintain their fertilization capacity**» Anim Reprod Sci; 136(4):280-8. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.10.027. Epub 2012 Nov 1

[5] Fouchécourt S, Métayer S, Locatelli A, Dacheux F, Dacheux JL, 2000 « **Stallion epididymal fluid proteome : qualitative and quantitative characterization ; secretion and dynamic changes of major proteins** » Biol Reprod; 62(6):1790-803

[6] Heise A, Thompson PN, Gerber D, 2011 « **Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal**

**spermatozoa** » Anim Reprod Sci; 123(3-4):192-201. Epub 2010 Dec 21

[7] Heise A, Kähn W, Volkmann DH, Thompson PN, Gerber D, 2010 « **Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa** » Anim Reprod Sci; 118(1):48-53

[8] Töpfer-Petersen E, Ekhlasi-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H, 2005 « **The role of stallion seminal proteins in fertilisation** » Anim Reprod Sci; 89(1-4):159-70

[9] Retamal C, Urzúa J, Lorca C, López ML, Alves EW, 2000 « **Changes in the plasma membrane proteins of stallion spermatozoa during maturation in the epididymis** » J Submicrosc Cytol Pathol; 32(2):229-39

[10] López ML, Olea N, Retamal CA, 2007 « **Post-testicular changes in the density and distribution of intramembrane particles of stallion sperm surface domains** » Anim Reprod Sci; 100(1-2):204-10. Epub 2006 Oct 2

[11] Pamornsakda T, Pojprasath T, Suwimonteerabutr J, Tharasanit T, 2011 « **Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the quality of frozen-thawed equine epididymal sperm** » Cryobiology; 63(2):90-5. Epub 2011 Jun 12

[12] Baker MA, Nixon B, Naumovski N, Aitken RJ, 2012 « **Proteomic insights into the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa** » Syst Biol Reprod Med; 58(4):211-7. doi: 10.3109/19396368.2011.639844

[13] Dacheux JL, Belleannée C, Guyonnet B, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Ecroyd H, Druart X, Gatti JL, Dacheux F, 2012 « **The contribution of proteomics to understanding epididymal maturation of mammalian spermatozoa** »

[14] Krapf D, Ruan YC, Werthmeier EV, Battistone MA, Pawlak JB, Sanjay A, Pilder SH, Cuasnicu P, 2012 « **cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit** » *Dev Biol*; 369(1):43-53. doi: 10.1016/j.ydbio.2012.06.017. Epub 2012 Jun 30

[15] Fàbrega A, Puigmulé M, Bonet S, Pinart E, 2012 « **Epididymal maturation and ejaculation are key events for further in vitro capacitation of boar spermatozoa** » *Theriogenology*; 78(4):867-77. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.039. Epub 2012 Jun 14

[16] Noblac A, Kocer A, Drevet JR, 2012 « **Post-testicular protection of male gametes from oxidative damage. The role of epididymis** » *Med Sci (Paris)*; 28(5):519-25. doi: 10.1051/medsci/2012285017. Epub 2012 May 30

[17] Gloria A, Contri A, De Amicis I, Robbe D, Carluccio A, 2011 « **Differences between epididymal and ejaculated sperm characteristics in donkey** » *Anim Reprod Sci*; 128(1-4):117-22. doi: 10.1016/j.anireprosci.2011.09.007. Epub 2011 Sep 25

[18] Belleannée C, Belzaghi M, Labas V, Teixeira-Gomes AP, Gatti GL, Dacheux JL, Dacheux F, 2011 « **Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation** » *Proteomics*; 11(10):1952-64. doi: 10.1002/pmic.201000662. Epub 2011 Apr 7

- [19] Cohen DJ, Maldera JA, Vasen G, Ernesto JI, Muñoz MV, Battistone MA, Cuasnicú PS, 2011 « **Epididymal protein CRISP1 plays different roles during the fertilization process** » J Androl; 32(6):672-8. doi: 10.2164/jandrol.110.012922. Epub 2011 Mar 25
- [20] Whelley S, Johnson S, Powell J, Borchardt C, Hastert MC, et al., 2012 « **Nonpathological extracellular amyloid is present during normal epididymal sperm maturation** » PLoS ONE; 7(5):e36394. doi: 10.1371/journal.pone.0036394
- [21] Krutskikh A, Poliandri A, Cabrera-Sharp V, Dacheux JL, Poutanen M, Huhtaniemi I, 2012 « **Epididymal protein Rnase 10 is required for post-testicular sperm maturation and male fertility** » The FASEB Journal Vol.26 October 2012
- [22] Chauvin T, Xie F, Liu T, Nicora CD, Yang F, Camp DG II, Smith RD, Roberts KP, 2012 « **A systematic analysis of a deep mouse epididymal sperm proteome** » Biology of Reproduction; 87(6):141, 1-8 doi: 10.1095/biolreprod.112.104208
- [23] Rajesh K Naz, Preeti B Rajesh, 2004 « **Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction** » Reproductive Biology and Endocrinology; 2:75 doi: 10.1186/1477-7827-2-75
- [24] Fouchécourt S, Dacheux F, Dacheux JL, 1999 « **Glutathione-independent prostaglandin D2 synthase in ram and stallion epididymal fluids : origin and regulation** » Biology of Reproduction Vol.60 n°3, 558-566 doi: 10.1095/biolreprod60.3.558

- [25] Card C, 2005 « **Cellular association and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology** » Theriogenology; 64(2005) 558-567
- [26] Juyena NS, Stelletta C, 2012 « **Seminal plasma: an essential attribute to spermatozoa** » Journal of Andrology Vol.33 n°4
- [27] Keber R, Rozman D, Horvat S, 2013 « **Sterols in spermatogenesis and sperm maturation** » J Lipid Res; 54(1):20-33. doi: 10.1194/jlr.R032326. Epub 2012 Oct 23
- [28] Shukla KK, Mahdi AA, Rajender S, 2012 « **Apoptosis, spermatogenesis and male infertility** » Front Biosci (Elite Ed.); 4:746-54
- [29] Nixon B, Ecroyd HW, Dacheux JL, Jones RC, 2011 « **Monotremes provide a key to understanding the evolutionary significance of epididymal sperm maturation** » J Androl; 32(6):665-71. doi: 10.2164/jandrol.110.012716. Epub 2011 Mar 25
- [30] Shum WW, Ruan YC, Da Silva N, Breton S, 2011 « **Establishment of cell-cell cross talk in the epididymis: control of luminal acidification** » J Androl; 32(6):576-86. doi: 10.2164/jandrol.111.012971. Epub 2011 Mar 25
- [31] Legge 15 Gennaio 1991, n°30 « **Specie Equina: fecondazione pubblica e privata** »
- [32] FIA (fondo italiano per l'allevamento),2005 « **Codice di comportamento per la prevenzione di malattie batteriche trasmesse per via venerea** » [www.stallonipurosangue .it](http://www.stallonipurosangue.it)

[33] Mc Kinnon AO, Voss JL, 1993 « **Equine Reproduction** » Williams & Wilkins, Philadelphia: 646-678

[34] [www.vetman.fi/user files/Leaflet Equipro en.pdf](http://www.vetman.fi/user_files/Leaflet_Equipro_en.pdf)

[35] Brown-Douglas CG, Firth EC, Parkinson TJ, Fennessy PF, 2004 « **Onset of puberty in pasture-raised Thoroughbreds born in southern hemisphere spring and autumn** » Equine Vet J.; 36(6)499-504

[36] Barrier-Battut I, Bonnet C, Giraudo A, Dubois C, Caillaud M, Vidament M, 2013 « **Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa** » Reprod Dom Anim; 48, 64-71; doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02026.x

[37] Noakes DE, Parkinson TJ, England GCW, 2001 « **Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics** » Saunders Elsevier eighth editions