



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

TESI DI LAUREA

**DILUIZIONE POST SCONGELAMENTO CON EQUIPRO ADDIZIONATO O MENO
CON ALFA-TOCOFEROLO ED EFFETTI SULLA QUALITÀ DEL MATERIALE
SEMINALE EQUINO**

Relatore: **Dott.ssa Maria Elena FALOMO**

Correlatore: **Prof. Roberto MANTOVANI**

Laureanda: **Chiara PERISSINOTTO**

A. A. 2010/2011

SOMMARIO

1	INTRODUZIONE	5
1.1	CARATTERISTICHE QUALI- E QUANTITATIVE DEL SEME DI STALLONE E FUNZIONI DEL PLASMA SEMINALE	5
1.2	LA CELLULA SPERMATICA	7
1.2.1	<i>Struttura e morfologia</i>	8
1.2.2	<i>Metabolismo e attività mitocondriale</i>	9
1.3	CAPACITAZIONE, IPERATTIVAZIONE E REAZIONE ACROSOMIALE	11
1.4	VALUTAZIONI QUANTI- E QUALITATIVE DEL SEME	13
1.5	SEME CONGELATO	15
1.5.1	<i>Diluenti (extenders)</i>	16
1.5.1.1	Equipro™	17
1.5.2	<i>Crioprotettori (freezing extenders)</i>	17
1.5.3	<i>Antiossidanti</i>	18
1.5.3.1	α tocoferolo	20
1.6	DANNI CELLULARI CORRELATI AL PROCESSO DI CONGELAMENTO E DI SCONGELAMENTO	21
1.6.1	<i>Danno di membrana</i>	22
1.6.2	<i>Danno osmotico</i>	25
1.6.3	<i>Danno ossidativo</i>	27
2	OBIETTIVI	31
3	MATERIALI E METODI	33
4	RISULTATI E DISCUSSIONE	37
4.1	<i>Quadro generale</i>	37
4.2	<i>Motilità totale e progressivamente lineare</i>	38
4.3	<i>Analisi della varianza e confronti</i>	41
4.5	<i>Il movimento</i>	55
4.6	<i>Lo stato ossidativo</i>	59
4.7	<i>Effetti differenziali sul movimento tra stalloni good e bad freezer</i>	60

5	CONCLUSIONI	65
6	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	67

1 Introduzione

1.1 Caratteristiche quali- e quantitative del seme di stallone e funzioni del plasma seminale

Un normale volume di eiaculato può variare da 20 a 250 ml con un volume medio di 50-60 ml [10]. La quantità di eiaculato emesso può dipendere da alcuni fattori come la stimolazione sessuale prima della raccolta, le condizioni di monta e la frequenza di prelievo. La concentrazione spermatica media varia dai 100 ai 300 milioni di spermatozoi/ml, anche se il *range* può andare da 50 a oltre 500 milioni di spermatozoi per ml in base allo stallone e alla frequenza di prelievo [10] ed è inversamente proporzionale al volume [11]. Il pH varia da 6.2 a 7.8 e l'osmolarità da 300 a 334 mOsm/kg. Il pH e l'osmolalità sono parametri che possono variare leggermente tra eiaculati e tra periodi diversi della stagione riproduttiva. Le caratteristiche biochimiche del seme equino sono simili a quelle degli altri mammiferi domestici, ma con alcune differenze. Tra gli zuccheri presenti, il glucosio è più abbondante rispetto al fruttosio (82mg/dl di glucosio contro i 2mg/dl di fruttosio), che invece è lo zucchero più abbondante nel seme dei ruminanti e il substrato energetico principale [33]. Il seme equino contiene alti livelli di acido lattico (prodotto dalle cellule del Sertoli [10]) e di sorbitolo, ma le cellule non sono in grado di metabolizzarlo [34]. Altre sostanze rinvenibili sono la gliceril fosforil colina (3.8mg/ml), l'ergotioneina (0.8mg/ml) e l'acido citrico (2.6mg/ml) che vengono prodotte rispettivamente dall'epididimo, dalle ghiandole ampollari e dalle ghiandole vescicolari [9,10,33]. Le funzioni dell'acido citrico sono state finora solo ipotizzate, e potrebbero essere quelle di formare complessi con il calcio (Ca^{2+}), di svolgere un'azione tampone e di contribuire al mantenimento dell'equilibrio osmotico [33]. In uno studio italiano sul plasma seminale equino, elevate concentrazioni di acido citrico (circa 40mg/dl) sono state associate a una ridotta percentuale di spermatozoi motili e a un'abbassamento del pH, mentre basse concentrazioni di fruttosio (circa 4mg/dl) sono

associate a un'elevata quota di spermatozoi immobili [33]. Probabilmente, le elevate concentrazioni di acido citrico legano la maggior parte del Ca^{2+} ionico disponibile, impedendo agli spermatozoi di capacitarsi, reazione indotta dall'ingresso di Ca^{2+} ionico nella cellula, e abbassano il pH a un punto tale da inibire il movimento. Tutte le sostanze antiossidanti si trovano nel plasma seminale e non nel citoplasma come in tutte le altre cellule dell'organismo, poiché durante lo sviluppo lo spermatozoo perde la maggior parte del suo citoplasma. L'antiossidante enzimatico più rappresentato è la catalasi [6,9] che scinde il perossido d'idrogeno ad acqua ed è prodotto dalla prostata. La catalasi è risultato essere l'unico enzima in grado di contrastare completamente gli effetti tossici dei radicali dell'ossigeno [41]. L'attività enzimatica e la concentrazione di macro- e microelementi nel plasma seminale è stata misurata nello studio di *Pesch et al.* (2006) [21]. E' stata studiata l'attività degli enzimi aspartato-amino-transferasi (AST), lattato deidrogenasi (LDH), γ -glutamyl-transferasi (GGT), fosfatasi acida (AcP) e alcalina (AIP). Di questi enzimi solo la GGT e la LDH sono positivamente correlate con la motilità totale e progressiva [21]. Tra i macroelementi rinvenuti c'è il sodio (Na^+), il potassio (K^+), il calcio (Ca^{2+}), il magnesio (Mg^{2+}), il fosforo (P) ed il cloro (Cl), mentre tra i microelementi sono annoverati il rame (Cu^+), il ferro (Fe^{2+}) e lo zinco (Zn^{2+}) [21]. La concentrazione dei fosfati è significativamente correlata al valore di pH. Il Ca^{2+} allo stato ionico induce la reazione acrosomiale, il Cu^+ entra a far parte dell'enzima superossido dismutasi (SOD) e del citocromo c (importante componente della catena della fosforilazione ossidativa), il Fe^{2+} ha un'azione antiossidante sugli enzimi ai quali è legato (lattoferrina, aptoglobulina e transferrina) e lo Zn^{2+} è coinvolto nella maturazione degli spermatozoi, nella stabilizzazione delle membrane attraverso l'inibizione delle fosfolipasi, nella protezione degli acidi grassi e dei gruppi tiolici (SH) dall'ossidazione mediata dal Fe^{2+} libero e a concentrazioni fisiologiche impedisce l'ingresso dello ione Ca^{2+} per evitare una reazione acrosomiale troppo precoce [8,21].

Il materiale seminale di uno stallone sano è normalmente privo di leucociti, mentre in caso d'infezione a carico dell'apparato genitale si può avere una contaminazione neutrofila del seme con riduzione della qualità, poiché i neutrofili producono importanti quantitativi di specie reattive dell'ossigeno [7].

Il plasma seminale ha molte funzioni correlate al metabolismo e alla fertilità spermatica: attivazione degli spermatozoi immotili, azione battericida, neutralizzazione di metaboliti e

cataboliti prodotti, nutrizione delle cellule nel tratto genitale femminile, protezione dell'epitelio e dello spermatozoo dalla proteasi acrosina. E' importante inoltre per la capacitazione e l'immunomodulazione. L'effetto del plasma seminale sulla conservazione della motilità è ancora controverso, anche se si riscontra una diminuzione della motilità nel materiale seminale scongelato dove il plasma seminale non è rimosso completamente [21] anche se la sua rimozione comporta l'eliminazione delle difese antiossidanti rendendo il seme congelato più vulnerabile allo stress ossidativo [7].

1.2 La cellula spermatica

Lo spermatozoo è la cellula più caratteristica dell'intero organismo, per via della sua forma particolare, perché il materiale genetico che contiene è aploide, non va incontro a mitosi, ha una funzione altamente specializzata e le capacità di riparare eventuali danni sono limitate se non addirittura assenti [10]. Anche la forma e la funzione dei singoli organelli sono modificate per assolvere al meglio il compito dello spermatozoo, cioè la fecondazione dell'oocita. Affinché esso possa svolgere la sua funzione fecondante, lo spermatozoo deve possedere almeno cinque caratteristiche:

- Metabolismo per la produzione di energia
- Motilità progressivamente lineare
- Enzimi acrosomiali
- Corretta distribuzione lipidica nella membrana cellulare e acrosomiale per mantenerle stabili e permettere la fusione finale tra spermatozoo e oocita
- Proteine di membrana essenziali per la sopravvivenza nel tratto genitale femminile

Membrane cellulari intatte e funzione mitocondriale integra sono requisiti essenziali per la fecondazione, mentre DNA integro è vitale per il corretto sviluppo embrionale. Il movimento non solo serve al raggiungimento dell'oocita, ma anche alla penetrazione attraverso la zona pellucida [29].

1.2.1 Struttura e morfologia

Lo spermatozoo può essere suddiviso nelle seguenti regioni: testa, collo e coda, suddivisa a sua volta in un segmento intermedio, uno principale e uno terminale. La testa è costituita quasi esclusivamente dal nucleo che contiene il materiale genetico. Il nucleo nella parte rostrale della testa è coperto da una struttura altamente specializzata, chiamata cappuccio acrosomiale, ed è una vescicola che origina dall'organo del Golgi che contiene gli enzimi che andranno a lisare la zona pellucida dell'oocita al momento della penetrazione. Il collo e la coda dello spermatozoo contengono le strutture adibite al movimento, il sistema di microtubuli chiamato assonema, e il centro di produzione di energia. Nel collo sono localizzati i mitocondri che producono energia sotto forma di ATP. Il collo è il sito di connessione tra la testa e la coda e oltre ai mitocondri, contiene anche i centrioli dai quali origina il sistema di microtubuli. Anche il segmento intermedio contiene molti mitocondri che si dispongono lungo la circonferenza dell'assonema a formare una doppia spirale. L'assonema occupa tutta la lunghezza della coda. Il citoplasma è ridotto al minimo e non devono esserci dei corpi citoplasmatici residui [10]. La cellula spermatica, come ogni altra cellula, è avvolta da una membrana plasmatica a doppio strato fosfolipidico che contiene circa 14% di lipidi e il rapporto colesterolo:fosfolipidi equivale a 0.23. Il colesterolo è il principale sterolo presente nelle membrane degli spermatozoi equini e si aggira intorno al 37%, ma può variare tra diversi individui e tra eiaculati diversi dello stesso soggetto; serve per mantenere stabile l'organizzazione lamellare dei fosfolipidi ed è determinante nella modulazione della fluidità della membrana stessa [26]. Infatti, più colesterolo è presente in una determinata regione, meno fluida o flessibile essa sarà [10]. All'aumentare del contenuto in colesterolo però, si riduce la temperatura alla quale avviene la fase di transizione della membrana, mantenendola quindi più fluida a temperature più basse rispetto a membrane con un minor contenuto di colesterolo [1] influenzando la diversa sensibilità al freddo mostrata da individui diversi. La composizione lipidica e il contenuto di colesterolo varia tra specie, individui ed eiaculati dello stesso individuo, e può essere correlato non solo alla velocità di capacitazione, ma può anche influenzare la fertilità e l'adattabilità alla refrigerazione e al congelamento (concetto di *good* e *bad freezer/cooler*) [26,32,40]. Secondo *Parks et al.* la membrana cellulare ha una diversa composizione lipidica

e proteica in base alla regione spermatica che si considera, che ne rispecchia le diverse funzioni [10,26]. Il fosfolipide più rappresentato è la fosfatidilcolina, mentre l'acido grasso docosaesanoico (DHA) è tipico della cellula spermatica, compone quasi il 50% di tutti gli acidi grassi ed è particolarmente sensibile all'ossidazione [10]. E' stato dimostrato che l'integrazione della dieta con DHA per aumentarne il contenuto seminale, ha migliorato la motilità di seme di bassa qualità refrigerato e congelato [3].

Le proteine contenute nella membrana cellulare si aggirano attorno al 50% e sono importanti perché riducono la risposta immunitaria nel tratto genitale femminile, formano recettori e canali di membrana e si legano a recettori epiteliali e a recettori presenti sull'olemma [10]. La loro quantità e distribuzione si modifica durante lo stoccaggio nell'epididimo e la capacitazione.

La membrana cellulare è ancorata alle strutture circostanti, riveste tutta la superficie cellulare ma durante la reazione acrosomiale la porzione di membrana che ricopre l'acrosoma viene persa e permette la liberazione degli enzimi idrolitici. Inoltre va incontro a modificazioni strutturali fisiologiche durante la fase di capacitazione [10].

1.2.2 Metabolismo e attività mitocondriale

Lo spermatozoo è una cellula che non possiede capacità biosintetiche e quindi non è in grado di riparare eventuali danni cellulari, di sintetizzare proteine e di dividersi. Il metabolismo dello spermatozoo maturo è in grado di produrre solo l'energia necessaria per il movimento, per il metabolismo e per il mantenimento dell'equilibrio osmotico. Nello stallone il metabolismo è prevalentemente di tipo aerobico e dipende al 90% dai substrati presenti nel plasma seminale, perché i substrati endogeni sono molto limitati e non vi sono depositi di glicogeno [10]. L'energia spesa per il movimento ionico transmembrana è minima. La glicolisi avviene principalmente a spese dei monosaccaridi presenti nel plasma seminale, come il glucosio e il fruttosio. Gli spermatozoi equini metabolizzano soprattutto il glucosio, poco il fruttosio e per niente il sorbitolo, che sarebbe il componente più abbondante nel plasma seminale equino [10,34]. Il trasporto del glucosio all'interno della

cellula e la glicolisi avvengono con un sistema ATP dipendente e quindi la glicolisi serve per la produzione di ATP e l'energia dell'ATP serve in parte per sostenere la glicolisi. Altri substrati che la cellula spermatica può utilizzare sono l'acido lattico, il glicerolo, gli acidi grassi e gli amminoacidi [34]. Il glucosio e il fruttosio attivano due diverse vie metaboliche e sembra che questo influenzi il tipo di movimento messo in atto: l'utilizzo del fruttosio induce un movimento lineare, mentre il glucosio ne induce uno più oscillatorio [37]. La produzione di ATP è temperatura dipendente: all'aumentare della temperatura, in un *range* che va da 22°C a 37°C, aumenta l'attività metabolica [10] e di conseguenza anche la motilità. Uno studio di microcalorimetria ha osservato che la velocità metabolica (misurata come quantità di calore prodotto) dipende dalla concentrazione glucidica: mentre una concentrazione di 3mM di glucosio induceva la minor quantità di calore prodotto, la concentrazione massima di 12mM di glucosio non portava alla massima produzione di calore, ottenuta invece con una concentrazione di 6mM di glucosio, a dimostrazione del fatto che c'è un effetto inibitorio sul metabolismo dato da concentrazioni eccessivamente elevate di glucosio [34]. In condizioni ipossiche le cellule passano al metabolismo anaerobico con la produzione finale di acido lattico. La produzione di acido lattico aumenta all'aumentare della concentrazione di glucosio disponibile [34] e l'accumulo di questo metabolita diminuisce il pH del mezzo, rallentando il metabolismo e la produzione di ATP con perdita di motilità. Modificazioni del pH possono avvenire anche durante l'abbassamento della temperatura, la quale modifica direttamente sia il pH sia il grado di dissociazione acida degli ioni disciolti [10].

Il metabolismo aerobico ha sede nei mitocondri e la sintesi di ATP è il prodotto finale della fosforilazione ossidativa [10,36]. La funzionalità di questa via metabolica dipende dall'integrità della membrana mitocondriale interna ed esterna e dalla disponibilità di ossigeno. Studi di umana dimostrano come il metabolismo aerobico di spermatozoi normali produca livelli molto bassi di ROS, ma non appena la catena della fosforilazione ossidativa viene disaccoppiata, l'attività *redox* e quindi la produzione di specie reattive dell'ossigeno aumenta notevolmente [40]. La principale specie reattiva prodotta è l'anione superossido che viene subito convertito a perossido d'idrogeno, spontaneamente o dall'enzima superossido dismutasi [6]. Il perossido d'idrogeno è considerato la specie reattiva dell'ossigeno più tossica per la cellula spermatica [10,34] perché in grado di bloccare il metabolismo ossidativo [40], il movimento, la vitalità, la reazione acrosomiale e la fusione con l'oocita

tramite la perossidazione lipidica [6]. Il ruolo dell'ATP di origine mitocondriale nel sostenere il movimento [26] è stato ultimamente rivisitato. Uno studio ha dimostrato come gli spermatozoi sottoposti a un composto chimico in grado di bloccare la catena della fosforilazione ossidativa non sono morti, ma anzi, hanno mantenuto inalterata la loro motilità [36]. La guaina fibrosa del flagello contiene enzimi glicolitici e in uno studio su topi *knock out* privati di uno di questi enzimi, gli spermatozoi erano immobili [36]. Sulla base di questi risultati, l'autore ipotizza che l'ATP prodotto dai mitocondri serva principalmente per mantenere l'equilibrio osmotico e i trasporti trans membrana della testa e della regione centrale, mentre sia la glicolisi la fonte principale dell'energia utile al movimento [36,39]. L'attività *redox* dei mitocondri murini è inoltre negativamente correlata alla linearità e alla rettilineità del movimento spermatico [39].

1.3 Capacitazione, iperattivazione e reazione acrosomiale

Affinché gli spermatozoi siano in grado di fecondare l'oocita, devono andare incontro a diverse modificazioni. Una volta prodotti dai testicoli vengono immagazzinati nell'epididimo dove maturano e acquisiscono la capacità motoria. Appena deposti in utero, gli spermatozoi devono subire ulteriori modificazioni, come la capacitazione e la reazione acrosomiale, per essere in grado di fecondare l'oocita.

La capacitazione è quel fenomeno per cui la membrana cellulare si modifica e permette alla cellula spermatica di legarsi alla zona pellucida dell'oocita e di innescare quindi la reazione acrosomiale [10]. Un leggero stato perossidativo sembra promuovere la capacitazione [26] e nel seme umano è promossa in particolare dal perossido d'idrogeno e dall'anione superossido [9]. A riprova di ciò, la reazione viene inibita dagli enzimi superossido dismutasi e catalasi [40]. Nei topi, nei criceti e nei suini è stato messo in evidenza come il bicarbonato *in vitro* causi una rapida modificazione nella struttura lipidica della membrana cellulare simile a quella che avviene durante la capacitazione, per cui si può ipotizzare che il bicarbonato giochi un ruolo chiave in tale reazione, almeno *in vitro* [27]. Le modificazioni alle quali la membrana cellulare dell'intera cellula va incontro sono la rimozione del colesterolo

dal doppio strato fosfolipidico da parte di albumine presenti nell'ambiente genitale femminile e la rimozione, o l'alterazione, del contenuto proteico di membrana per aumentare la fluidità e l'instabilità della membrana, per modificare il flusso ionico transmembrana (in particolare quello del Ca^{2+}), per esporre siti recettoriali e per rimuovere dalla membrana molecole che ricoprono il flagello e che sembrano impedire il movimento flagellare iperattivo. Le modificazioni a carico della membrana che ricopre la testa quindi facilitano il legame dello spermatozoo alla zona pellucida dell'ovocita e l'innesco della reazione acrosomiale; le modificazioni invece a carico della membrana che ricopre il flagello favoriscono la motilità iperattiva e le modificazioni a carico della membrana mitocondriale aumentano il metabolismo e facilitano la trasmissione di energia [10]. La capacitazione modifica il movimento dello spermatozoo da progressivamente lineare a non progressivo; è un movimento molto vigoroso nel quale la coda si muove in modo simile a colpi di frusta causando un movimento della testa a forma di stella o di 8 che viene chiamato movimento iperattivato. Il *pattern* di iperattivazione è caratterizzato da elevati valori del parametro ALH, lo spostamento laterale della testa [37]. Si pensa che l'iperattivazione serva a evitare allo spermatozoo di legarsi ai recettori epiteliali delle tube uterine, per penetrare attraverso il muco dell'ovidotto e attraverso il cumulo ooforo e per giungere fino alla zona pellucida [10,37]. L'iperattivazione di per sé non è un evento negativo ma riduce enormemente la vita dello spermatozoo [37]. Il movimento iperattivato è sostenuto da un'aumentata attività metabolica mitocondriale con una maggiore produzione di ATP.

La reazione acrosomiale è attivata dall'ingresso massiccio di ioni Ca^{2+} nella cellula, facilitato dalle modificazioni di membrana indotte dalla capacitazione, in seguito al legame con recettori della zona pellucida e consiste nella fusione della vescicola acrosomiale con la membrana cellulare sovrastante con conseguente esocitosi degli enzimi idrolitici contenuti. Questi enzimi idrolizzano la zona pellucida e permettono allo spermatozoo di penetrarla e di legarsi all'oolemma.

I processi di congelamento inducono negli spermatozoi modificazioni simili alla capacitazione [27,36,37,40], soprattutto con l'utilizzo di diluitori a base di latte e glucosio [27]. Lo studio di *Schembri et al.* (2003) ha dimostrato come, indipendentemente dal mestruo diluitore utilizzato, allo scongelamento aumenta la proporzione di spermatozoi andati incontro alla capacitazione e alla reazione acrosomiale rispetto a quelli non capacitati, ma come la

percentuale di spermatozoi progressivamente motili (e quindi non capacitati) sia influenzata dal tipo di mestruo diluitore utilizzato. L'autore ipotizza quindi, che le diverse sostanze e caratteristiche dei vari diluitori possano indurre modificazioni di membrana a velocità diverse [27].

La ridotta fertilità del seme congelato rispetto al seme fresco può essere in parte dovuta al fatto che aumenta la quota di spermatozoi capacitati, che non avendo più un movimento di tipo lineare, difficilmente riescono a raggiungere le tube uterine; sono inoltre più fragili, instabili e con una vita più breve. Gli spermatozoi con la reazione acrosomiale già avvenuta perdono parte del loro potenziale di fecondazione [27].

1.4 Valutazioni quanti- e qualitative del seme

Una valutazione di *routine* può essere articolata nel modo seguente:

- Volume e colore
- Ph e osmolarità
- Concentrazione spermatica
- Motilità
- Morfologia spermatica

La motilità è una delle più importanti caratteristiche di cui è dotato lo spermatozoo per raggiungere l'oocita. L'analisi oggettiva effettuata dal sistema computerizzato CASA permette una rapida valutazione qualitativa e quantitativa della motilità e di altri parametri ad essa correlati [37].

I parametri principali calcolati di *routine* con l'ausilio del computer rientrano nella categoria della motilità spermatica [11]. I seguenti parametri sono stati calcolati anche in questo lavoro.

- MOT: spermatozoi motili con VAP o VCL > x $\mu\text{m/s}$
- PMS: spermatozoi progressivamente motili con VAP o VCL > x $\mu\text{m/s}$ e LIN o STR > 1; per essere considerato progressivamente motile lo spermatozoo deve attraversare il campo microscopico a una velocità ragionevolmente elevata e la testa deve ruotare di 360° grazie ai movimenti in avanti e in dietro della coda [10].
- VCL: velocità curvilinea, è la velocità media misurata punto per punto sulla traccia percorsa dallo spermatozoo ($\mu\text{m/s}$)
- VAP: velocità media, è la velocità della traiettoria media ($\mu\text{m/s}$)
- VSL: velocità rettilinea, è la velocità lungo la linea retta di congiunzione tra la posizione iniziale e finale dello spermatozoo ($\mu\text{m/s}$)
- LIN: linearità del movimento è data dal rapporto VSL/VCL (%) e stima l'approssimarsi di ogni singola traccia alla linea retta)
- STR: rettilineità è data dal rapporto VSL/VAP (%) e stima l'approssimarsi della traccia media alla linea retta)
- ALH: ampiezza dello spostamento laterale della testa (μm)

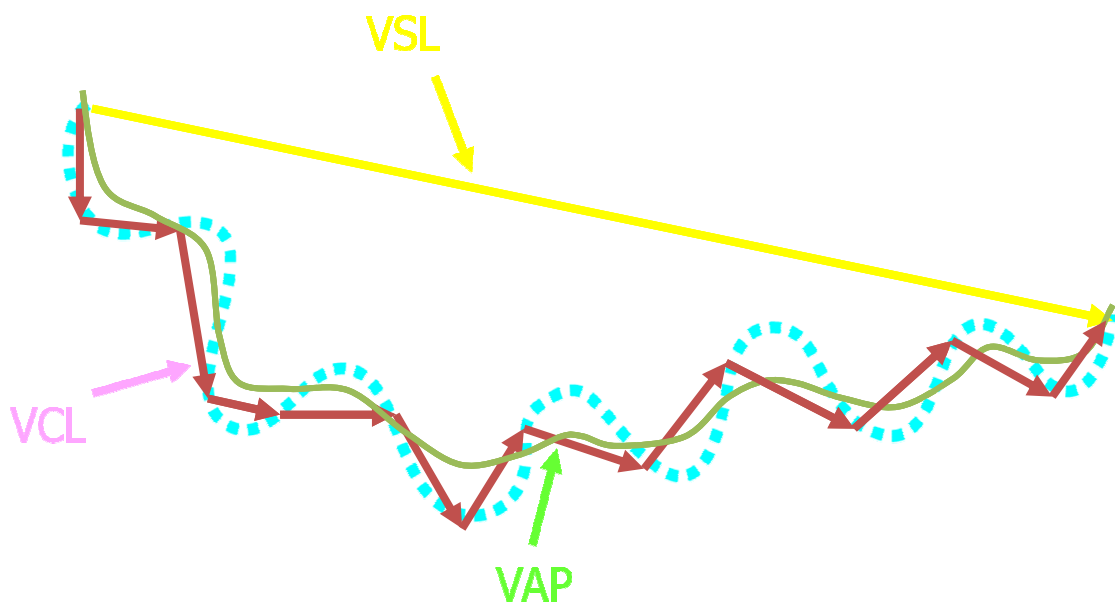


Fig. 1.1: rappresentazione grafica della traiettoria effettiva dello spermatozoo (linea azzurra tratteggiata), della velocità rettilinea (retta gialla), della velocità curvilinea (linea bordeaux) e della velocità media (linea verde)

Secondo uno studio, la valutazione della concentrazione di spermatozoi motili post scongelamento non è un buon indicatore di fertilità del materiale seminale congelato, poiché è stato riportato che anche stalloni con una motilità post scongelamento inferiore al 30% hanno avuto un tasso di concepimento accettabile, contrariamente alcuni stalloni con motilità superiore al 40% hanno avuto tassi di concepimento molto bassi [12]. Un altro studio però ha messo in luce come la valutazione delle caratteristiche di movimento fatta due o quattro ore dopo lo scongelamento, a una temperatura simile a quella corporea, sia maggiormente correlata alla fertilità rispetto alla valutazione immediata [29,30], poiché mette in luce la situazione che si potrebbe venire a creare nelle tube uterine al momento in cui l'oocita viene raggiunto.

La valutazione dell'integrità di membrana e dello stato dell'acrosoma sono buoni indicatori di qualità, che al momento rientrano nelle analisi di *routine* del seme congelato suino [30].

1.5 Seme congelato

Nonostante i vantaggi forniti dalla conservazione nel tempo del seme, la criopreservazione, e il successivo scongelamento, riduce la quota di spermatozoi completamente funzionali perché può causare danni irreversibili alle cellule spermatiche portando a una perdita più o meno consistente di spermatozoi motili e vitali con conseguente importante riduzione della fertilità e della longevità del seme congelato rispetto al seme fresco e refrigerato [1,8,12,16,26,29,30,42]. Infatti per ottenere lo stesso livello di fertilità del seme fresco, nel bovino bisognerebbe fecondare con una quantità otto volte maggiore di seme congelato [40]. Le procedure di congelamento del seme equino non sono ancora ottimali vista l'importante variabilità nei risultati tra individui e, a volte, tra eiaculati diversi di un soggetto. I fattori che possono influenzare il processo di congelamento sono il tipo di crioprotettore usato e la sua dose, la velocità di raffreddamento, la composizione del mestruo diluitore, la resistenza dello spermatozoo allo stress osmotico e la possibile interazione tra i fattori [15].

Il seme congelato viene conservato in azoto liquido a -196°C e se durante il periodo di conservazione le temperature non salgono oltre i -130°C le sue caratteristiche qualitative vengono mantenute inalterate per almeno dieci anni [3].

La federazione mondiale per l'allevamento equino (WBFSH) pone degli standard di qualità relativi al materiale seminale equino congelato:

- Minimo 250 milioni di PMS: spesso il limite non viene rispettato perché non tutti gli stalloni approvati e scelti in base alle prestazioni sportive si rivelano poi dei buoni riproduttori;
- Percentuale di spermatozoi progressivamente motili non inferiore al 35% post scongelamento al momento dell'inseminazione [3,18];

1.5.1 Diluitori (extenders)

L'*extender*, o mestruo diluitore, è quel prodotto utilizzato per diluire il materiale seminale per la produzione di seme refrigerato e congelato. Il diluitore serve per prolungare la vita degli spermatozoi e permetterne la conservazione nel tempo fornendo loro sostanze nutritive (zuccheri), stabilizzando i sistemi enzimatici, mantenendo le membrane integre, controllando il pH e l'osmolarità (attraverso gli elettroliti), aumentando le difese antiossidanti, proteggendo dallo shock da freddo (tramite proteine) e dai cataboliti tossici prodotti dagli spermatozoi stessi e prevenendo la crescita microbica (con l'utilizzo di antibiotici) [26,28]. Serve inoltre a rendere il seme più maneggevole, poiché gli spermatozoi non diluiti tendono ad agglomerarsi rendendo impossibile una loro corretta valutazione [10]. Aumenta inoltre il volume totale permettendo l'inseminazione di un numero maggiore di cavalle [14]. Sono state effettuate molte prove per trovare il diluitore ideale, ma la risposta resta soggettiva [12,14]. L'effetto protettivo dei diluitori è stato dimostrato nel lavoro di *Aurich et al.* (2006), nel quale il seme diluito con PBS (semplice soluzione salina fosfata) ha perso una maggiore quantità di cellule a causa della rottura della membrana cellulare rispetto al seme diluito con *EquiproTM* o con il *Kenney extender* [16]. L'efficacia dei diluitori viene verificata attraverso la valutazione della motilità spermatica e del tasso di

concepimento, ma spesso si tiene conto solo del parametro motilità che è quello maggiormente relazionato alla fertilità e il più semplice da ottenere.

1.5.1.1 Equipro™

Il prodotto commerciale *Equipro™* (Minitüb) è un mezzo di cultura per la conservazione del materiale seminale equino adatto anche come diluitore per la centrifugazione. L'aspetto è bianco latte ed è costituito da caseinati derivanti da diverse frazioni della caseina del latte, contiene zuccheri, sostanze tampone e gentamicina. Il pH è 7.0 ± 0.3 e l'osmolarità è 315 ± 10 Osm/kg. La formula resta protetta da brevetto [44].

1.5.2 Crioprotettori (*freezing extenders*)

I crioprotettori sono quelle sostanze che vengono aggiunte al seme già diluito, affinché possa sopravvivere al processo di congelamento e di scongelamento [3,15]. I crioprotettori si possono suddividere in penetranti e non penetranti la membrana cellulare [4].

Tra quelli penetranti c'è il glicerolo, il glicole etilenico, il glicole propilenico e la dimetilformamide e agiscono nell'ambiente sia extra- sia intracellulare [14]. Il meccanismo d'azione ipotizzato è reso possibile dalla caratteristica di avere il punto di congelamento inferiore a quello dell'acqua. Ciò porterebbe a una situazione in cui, a qualsiasi temperatura, ci sarebbe sempre una parte di solvente non congelato maggiore rispetto alla semplice soluzione acquosa, evitando l'eccessiva concentrazione di soluti che altrimenti potrebbero divenire tossici per lo spermatozoo [14]. Il glicerolo è la molecola più utilizzata, è lipofila e si sostituisce all'acqua; l'azione protettiva consiste in:

- Stabilizzare le membrane plasmatiche [4];
- Ridurre la velocità di formazione dei cristalli di ghiaccio[3];

- Ridurre le dimensioni dei cristalli di ghiaccio intracellulari: permette la formazione di cristalli piccoli e regolari solo quando vengono raggiunte temperature di circa -80°C [3];
- Aumentare la fluidità delle membrane [40];
- Aumentare la permeabilità all'acqua permettendone un'uscita più rapida [40];

Secondo uno studio di *Fiser e Fairfull* del 1990, la concentrazione ottimale di glicerolo è del 3% [14].

Tra i crioprotettori non penetranti ci sono gli zuccheri come il saccarosio e il trealosio che modulano la pressione osmotica attraverso la formazione di legami idrogeno tra le teste polari dei fosfolipidi di membrana e i gruppi idrossilici degli zuccheri [4]. Aumentando la pressione osmotica extra cellulare, richiamano acqua all'esterno riducendo il rischio della formazione di grandi cristalli di ghiaccio intracellulari [14].

Recentemente la dimetilformamide usata al 5% è stata considerata un crioprotettore alternativo, soprattutto con il seme di soggetti *bad freezer*, mentre usata al 2% ha migliorato la motilità seminale di soggetti *good freezer* [15] e rispetto al glicerolo ha mantenuto percentuali di motilità progressiva più elevate [1].

I crioprotettori, non essendo sostanze normalmente presenti nelle cellule, possono avere anche un'azione tossica, che dipende dalla loro concentrazione e dalla durata di esposizione delle cellule prima del congelamento, causando il disassemblamento dei microtubuli e dei microfilamenti [3]. E' stato dimostrato che l'aumento delle concentrazioni di glicerolo oltre il 4% porta a una maggiore protezione delle cellule dal danno indotto dai cristalli di ghiaccio intracellulari ma aumenta eccessivamente lo stress osmotico a cui le cellule vengono sottoposte [3]. Già concentrazioni al 3% sembrano possedere una certa tossicità intrinseca e un'elevata osmolarità [31].

1.5.3 Antiossidanti

Gli antiossidanti presenti all'interno delle cellule e nell'ambiente circostante rappresentano il naturale meccanismo di difesa dallo stress ossidativo [9,38].

- Non enzimatici: la vitamina C (acido ascorbico), la vitamina E (tocotrienoli α , β , γ e δ e tocoferoli α , β , γ e δ) e la vitamina A;
- Enzimatici: la glutazione perossidasi (riduce il glutazione), la superossido dismutasi (converte l'anione superossido a perossido d'idrogeno) e la catalasi (converte il perossido d'idrogeno ad acqua);
- Metalli di transizione ferro e rame quando incorporati nelle proteine limitano la produzione di ROS;
- Altre sostanze antiossidanti: glutazione, acido piruvico, acido ferulico, albumina, taurina;

L'ergotioneina e la glicerilfosforilcolina sono sostanze presenti nel plasma seminale in grado di ridurre la lipoperossidazione [9]. La catalasi è l'enzima ad azione antiossidante, che se aggiunto nel diluitore, ha dimostrato il maggior effetto positivo sui parametri qualitativi di seme scongelato di cane [35]. L'albumina è una proteina extracellulare ad azione antiossidante in grado di legare gli ioni Fe^{2+} e Cu^+ per ridurre la formazione dell'anione perossido [8]. La taurina è considerata una molecola importante per la motilità e la fertilità spermatica e gioca un ruolo importante anche nella regolazione osmotica e nell'equilibrio ionico [35].

In uno studio su seme umano sono state trovate importanti variazioni nell'espressione dell'enzima mitocondriale glutazione perossidasi tra soggetti fertili e infertili [29]. Questo risultato può essere un buon punto di partenza per capire le differenze di motilità e di sensibilità alla perossidazione delle membrane che esistono nei diversi soggetti.

Già in precedenti lavori si è provato ad aggiungere antiossidanti, come l' α tocoferolo (*Beconi et al.* 1991 e 1993, *Aguero et al.* 1995, *Brezezinska-Slevbodzinska et al.* 1995 nel suino, *J.Almeida* 2004, *Ball et al.* 2005, *Breininger et al.* 2005, *Boscos et al.* 2007 nel cane) o come l'acido ascorbico nel cavallo (*Aurich et al.*, 1997) e nel bufalo (*Anrabi, Anrabi, Ullah, Afzal,* 2008). L'acido piruvico è un potente *scavenger* del perossido d'idrogeno e aggiunto nel seme congelato bovino diluito con il tuorlo d'uovo e in seme refrigerato bovino nel diluitore a base di latte ha migliorato i valori della motilità e del contenuto di ATP [8].

1.5.3.1 α tocoferolo

È la forma di vitamina E biologicamente più potente e attiva. Come tutte le altre isoforme è liposolubile, sensibile all'ossigeno e ai raggi UV e resistente al calore. Deve venire assunto con l'alimentazione, poiché le cellule dei mammiferi non sono in grado di sintetizzarla, viene assorbito a livello intestinale e nel plasma sanguigno si lega a una specifica proteina di trasporto, la *tocopherol binding protein* (TBP) e raggiunge così il fegato dove viene immagazzinato. Tale vitamina è un naturale componente della cellula ed esplica la sua azione antiossidante una volta incorporata nel doppio strato fosfolipidico. La sua azione principale non è quella di *scavenger*, cioè spazzino delle specie reattive dell'ossigeno, ma di *chain breaker*, che blocca cioè la propagazione a catena della perossidazione lipidica e neutralizza i radicali lipidici, proteggendo così i componenti delle membrane senza influenzare la produzione di ROS [2,35].

Effetti positivi in seguito all'aggiunta di tocoferolo sono stati riportati nel cavallo (*Aguero et al.*, 1997), nel tacchino (*Donoghue and Donoghue*, 1997), nel bovino (*Breininger et al.* 2004, *Beconi et al.* 1993), nel bufalo (*Andrabi et al.* 2008), nel suino (*Cerolini et al.*, 2000) ma non nell'ariete (*Upreti et al.*, 1997) [2]. Negli studi spesso sono stati utilizzati esteri del tocoferolo, come il succinato o l'acetato, perché sono più stabili e più idrosolubili del tocoferolo puro [2]. In modo particolare, il tocoferolo succinato (TS) è stato provato essere più efficace del tocoferolo non esterificato nel proteggere epatociti isolati contro i danni ossidativi e questo sembra essere dovuto al fatto che il tocoferolo succinato si accumula rapidamente all'interno dei mitocondri per essere poi gradualmente rilasciato alle membrane subcellulari [2]. Il TS si è dimostrato migliore nella prevenzione della perossidazione lipidica nelle cellule spermatiche, ma la motilità è stata mantenuta a livelli più elevati con l' α tocoferolo che non con il TS [2].

1.6 Danni cellulari correlati al processo di congelamento e di scongelamento

Il danno cellulare in generale è la conseguenza di alterazioni funzionali e biochimiche di uno o più componenti cellulari essenziali. I bersagli più importanti degli stimoli dannosi sono la catena della fosforilazione ossidativa mitocondriale, che produce ATP e fa parte del metabolismo aerobico, l'integrità della membrana plasmatica, del DNA e del citoscheletro [29,38]. I meccanismi biochimici responsabili del danno cellulare sono invece la deplezione di ATP, il danno mitocondriale, la perdita dell'omeostasi del calcio, lo stress ossidativo e i difetti di permeabilità della membrana [38].

Nella cellula spermatica il freddo e lo stress osmotico sono le principali cause di danno alle membrane [40]. Secondo *Graham* il principale danno da freddo al quale gli spermatozoi vanno incontro è quello che si verifica a carico della membrana plasmatica. Altri danni causati dal freddo che si possono verificare sono la formazione dei cristalli di ghiaccio, le alterazioni del DNA, lo stress osmotico e quello ossidativo [1,42]. Sia la membrana cellulare, sia quella mitocondriale sono vulnerabili ai processi di congelamento e scongelamento [29] e sembrano essere le strutture più sensibili [30]. Il danno al DNA, valutato in base al grado di frammentazione del filamento, indotto dal congelamento e dallo scongelamento, necessita di un maggiore periodo d'incubazione post scongelamento per manifestarsi in confronto alla perdita dell'integrità della membrana cellulare e del potenziale di membrana mitocondriale; ciò dimostra che il DNA è una struttura meno vulnerabile [29]. Bisogna inoltre tener conto della tossicità che possono causare i crioprotettori se usati con modalità e a concentrazioni inappropriate [14].

L'abbassamento della temperatura porta alla formazione di cristalli di ghiaccio, che se sono di grandi dimensioni possono danneggiare irreversibilmente la cellula [31]. Anche lo scongelamento danneggia le cellule, a causa della ricristallizzazione, e modifica ulteriormente il gradiente osmotico, procurando ulteriori danni alla membrana o morte cellulare. [31,40]. Generalmente, cellule che vengono congelate in modo rapido richiedono anche uno scongelamento rapido [31].

Uno studio su seme suino ha messo in evidenza come il contenuto lipidico si modifichi da prima a dopo il congelamento: nello specifico è aumentato il contenuto di acidi grassi saturi a discapito di quelli insaturi a lunga catena ed è diminuito il contenuto di colesterolo [32]. Gli

autori propongono come spiegazione della diminuzione del contenuto degli acidi grassi insaturi a lunga catena, la capacità delle membrane spermatiche di inglobare acidi grassi saturi presenti nell'ambiente, soprattutto quando diluiti con il tuorlo d'uovo, e l'aumento della perossidazione lipidica indotta dal congelamento. La riduzione del contenuto di colesterolo allo scongelamento trova analogie con la sua diminuzione durante la fase di capacitazione. Tale fenomeno è in accordo con l'osservazione che in seguito al congelamento aumenta la quota di spermatozoi con reazione acrosomiale avvenuta ed il fatto che il congelamento può essere un importante induttore della capacitazione è ben documentato [27,32].

1.6.1 Danno di membrana

Il danno di membrana porta alla perdita reversibile o irreversibile di motilità e di potere fecondante [23,26].

Tali danni coinvolgono sia la membrana cellulare, sia quella mitocondriale e di altri organelli cellulari e possono essere dovuti a un danno diretto, di tipo meccanico, o indiretto, come le alterazioni mitocondriali, lo stress ossidativo, il danneggiamento dei fosfolipidi di membrana e le alterazioni del citoscheletro. Il danno alla membrana plasmatica ne altera la permeabilità, causando la perdita dell'equilibrio osmotico, l'ingresso sregolato di liquidi e di ioni e la perdita di enzimi e molecole vitali per l'omeostasi della cellula [26,38]. L'abbassamento della temperatura determina dei cambiamenti reversibili o meno a carico dello spermatozoo, chiamati "*cold shock*" o *shock* da freddo [14]. Lo *shock* da freddo modifica l'ultrastruttura della membrana cellulare, in modo spesso irreversibile, da lievemente fino alla rottura vera e propria, e allo scongelamento si manifesta con ridotte dimensioni della testa, minor dinamicità e fluidità delle membrane, ridotta capacità rispetto al seme fresco di legarsi a recettori di membrana e perdita della permeabilità selettiva [40]. Questi cambiamenti possono essere diretti, cioè evidenti subito dopo l'abbassamento della temperatura, soprattutto se è stato repentino, o indiretti, cioè non sempre visibili e indipendenti dalla velocità di diminuzione della temperatura [14].

Il freddo altera la fluidità della membrana: con l'abbassarsi della temperatura la fase fluida della porzione lipidica passa a quella solida e cristallina e la porzione proteica si aggrega [10]. In spermatozoi murini il passaggio di fase avviene tra 4°C e 0°C [40]. Questi cambiamenti rendono la membrana instabile e ne alterano la permeabilità: le pompe ioniche ATP dipendenti perdono efficienza, con conseguente eccessiva fuoriuscita di K^+ e ingresso di Na^{2+} , portando a una persistente parziale depolarizzazione e a un'apertura dei canali al Ca^{2+} . La perdita dell'omeostasi del Ca^{2+} porta all'attivazione di enzimi ad attività litica come le ATPasi, le fosfolipasi, le proteasi e le endonucleasi. Aumenta inoltre la permeabilità mitocondriale e induce l'apoptosi [38]. Tutti questi cambiamenti avvengono gradualmente durante l'abbassamento della temperatura, ma se avviene troppo rapidamente, diventano irreversibili e portano a morte la cellula [14]. Il danno da freddo risulta essere più manifesto a livello di membrana cellulare della testa spermatica [9], dovuto probabilmente alla diversa composizione lipidica della membrana di questa regione.

La formazione dei cristalli di ghiaccio, causata dall'abbassamento della temperatura, è connessa alla destabilizzazione e al danneggiamento della membrana plasmatica e si può didatticamente suddividere in due fasi: la disidratazione da ghiacciamento e la formazione vera e propria di cristalli. Durante il processo di raffreddamento si formano cristalli di ghiaccio nello spazio extracellulare, che creano un gradiente osmotico che richiama acqua dalle cellule e porta a una loro diminuzione di volume (disidratazione da ghiacciamento) [3,5]. I cristalli di ghiaccio si formano anche nello spazio intracellulare e danneggiano, o addirittura rompono, le membrane degli organelli intracellulari con perdita della struttura intracellulare [3]. Processi di raffreddamento troppo rapidi o troppo lenti possono causare danni letali per le cellule spermatiche: gli abbassamenti troppo rapidi della temperatura portano alla formazione di numerosi cristalli di ghiaccio intracellulari, perché l'acqua non ha il tempo necessario per portarsi nello spazio extracellulare; con un raffreddamento troppo lento invece, la cellula va incontro a una disidratazione eccessiva, mentre un raffreddamento più graduale permetterebbe all'acqua di uscire dalla cellula e di ghiacciare esternamente [5]. Nella maggior parte dei casi le cellule con cristalli di ghiaccio intracellulari che coinvolgono più del 10%-15% dell'acqua iniziale o che si sono disidratate troppo, diventano osmoticamente inattive o vanno incontro a lisi, perché la membrana cellulare perde la sua integrità strutturale. La velocità di raffreddamento ideale dipende dalla permeabilità della

membrana cellulare all'acqua in presenza di ghiaccio extracellulare e di sostanze crioprotettive [5], per cui non è mai costante e deve essere in funzione della tecnica di congelamento adottata.

Bisogna inoltre tener conto delle dimensioni dei cristalli di ghiaccio: più sono grandi i cristalli di ghiaccio, più danni arrecano alle cellule, mentre i microcristalli che si formano con un abbassamento ultrarapido della temperatura non causano danni diretti. Se però lo scongelamento non è altrettanto rapido, i microcristalli si possono aggregare e formare dei complessi voluminosi che danneggiano la cellula.

Il danno mitocondriale consegue generalmente all'ipossia, alle tossine, allo stress ossidativo e alla degradazione dei fosfolipidi e si manifesta con l'aumento della permeabilità delle membrane e con la perdita del potenziale di membrana mitocondriale e porta al blocco della catena della fosforilazione ossidativa e della sintesi di ATP [36,38]. Nella cellula spermatica il danno mitocondriale è una conseguenza soprattutto dello stress ossidativo e del freddo e aumenta il danno ossidativo a carico dell'intera cellula e può indurre l'apoptosi a causa della liberazione dell'enzima citocromo C [38].

La deplezione e la riduzione della sintesi di ATP sono generalmente associate al danno ipossico, poiché viene a mancare l'ossigeno che attiva la catena della fosforilazione ossidativa e che esita nella sintesi dell'ATP; la produzione di ATP si riduce drasticamente anche quando gli enzimi delle vie metaboliche non sono più funzionanti o le membrane mitocondriali sono danneggiate; la deplezione di ATP può verificarsi ogni qualvolta la membrana cellulare viene danneggiata.

Le conseguenze della carenza di ATP sono le seguenti:

- Riduzione dell'attività della pompa di membrana Na^+ - K^+ ATP dipendente che porta a un aumento del Na^+ e a un calo del K^+ intracellulare ;
- Alterazione del metabolismo energetico: attivazione della via glicolitica per blocco della via fosforilativa con conseguente accumulo di acido lattico e riduzione del pH [34,38];
- Ridotta attività della pompa di membrana del Ca^{2+} con conseguente ingresso massiccio dello ione;
- Danni e alterazioni conformazionali a carico delle proteine [38]

1.6.2 Danno osmotico

Durante il processo di congelamento gli spermatozoi sono sottoposti a stress osmotico ogni qualvolta il crioprotettore viene aggiunto e rimosso e quando il diluente ghiaccia e si scioglie nuovamente, perché si modifica la concentrazione dei soluti e quindi l'osmolarità [1,42]. La cellula è sottoposta a *shock* osmotico anche al momento dell'inseminazione, poiché l'ambiente intracellulare è iperosmotico rispetto a quello extracellulare del tratto genitale femminile [1,3,14,42]. Gli spermatozoi equini sono particolarmente suscettibili al danno osmotico perché hanno una ridotta capacità di adattamento agli sbalzi osmotici (ambiente anisotonico) rispetto agli spermatozoi umani o bovini (ridotta finestra osmotica) [1]. La coda è la regione più sensibile agli sbalzi osmotici [15] e questo potrebbe spiegare perché il primo danno che si può notare è la perdita di motilità. Il danno o la lisi della membrana si manifesta quando l'aggiunta o la rimozione di sostanze osmoticamente attive causa un aumento o una riduzione tale del volume che va oltre le capacità di adattamento cellulare [1,42]. Nel lavoro di *Ball & Vo* del 2001 è stato messo in evidenza come l'aggiunta rapida, ma soprattutto la rimozione rapida, del crioprotettore nel seme non congelato causi una marcata riduzione della vitalità, della motilità e del potenziale di membrana mitocondriale a causa probabilmente del danneggiamento della membrana cellulare indotto dallo *shock* osmotico [15,42]. L'aggiunta graduale, in più momenti, del crioprotettore riduce meno la motilità e la funzionalità della membrana plasmatica rispetto all'aggiunta in un solo momento [15,43]. Tra i diversi crioprotettori testati il glicerolo è risultato essere il più dannoso e il glicole etilenico quello invece meno dannoso, probabilmente perché il glicole etilenico ha un peso molecolare minore ed è 1.5-3 volte più permeabile del glicerolo [15,42]. La maggiore tossicità del glicerolo può essere dovuta invece al fatto che possiede una permeabilità minore rispetto ad altri crioprotettori e all'acqua e quindi, attraversando più lentamente le membrane, non riesce a evitare variazioni di volume eccessivamente rapide e ampie [1]. Sostanze più permeabili, e quindi con un peso molecolare minore, sarebbero in grado di uscire più velocemente dalla cellula e di contrastare quindi un eccessivo ingresso di acqua che altrimenti porterebbe a un aumento di volume tale per cui la membrana cellulare verrebbe irreversibilmente danneggiata. La membrana infatti, oltre ad andare incontro a lisi, viene danneggiata soprattutto dal rapido e massiccio flusso d'acqua che attraversa la

membrana al momento della diluizione [42]. In uno studio comparativo tra diverse concentrazioni di glicole etilenico e il glicerolo al 3%, è risultato che le concentrazioni al 6% e al 9% di glicole etilenico riducevano significativamente i parametri di motilità, portando a supporre la presenza di un effetto tossico del crioprotettore sulla cellula spermatica, dovuto a un effetto diretto della molecola sulla cellula, alla pressione osmotica eccessivamente elevata o all'ingresso o alla fuoriuscita troppo veloce del crioprotettore [14], nonostante la maggiore permeabilità rispetto al glicerolo.

La riduzione dell'osmolarità ha effetti diversi rispetto al suo aumento: condizioni iposmotiche hanno intaccato l'integrità della membrana plasmatica a causa dell'elevato flusso d'acqua che attraversa la membrana, riducendo anche la motilità, mentre l'iperosmolarità ha ridotto solo la motilità senza danneggiare la struttura della membrana [42]. Una volta riportate le cellule a condizioni isoosmotiche, il danno indotto dall'iposmolarità non è reversibile [42] a dimostrazione del fatto che gli spermatozoi equini sono più sensibili alle diluizioni che all'aggiunta di sostanze osmoticamente attive [1]. L'HOS test (*hypo-osmotic test*) sfrutta proprio questo meccanismo di adattamento della cellula per studiare l'integrità funzionale della membrana plasmatica e per determinarne il livello di iposmolarità tollerata in base al momento in cui le cellule vanno incontro a lisi [26]. La riduzione della motilità in seguito alle variazioni di osmolarità è dovuta sia al danneggiamento della membrana plasmatica, sia alla perdita del potenziale di membrana mitocondriale [42]. E' importante anche il rapporto della diluizione post scongelamento: l'aggiunta di volumi maggiori di diluente aumenta lo stress osmotico perché incrementa il *gap* di osmolarità tra l'ambiente intracellulare e quello extracellulare dovuto all'improvvisa e importante riduzione della concentrazione di glicerolo extracellulare [43]. Nel lavoro di *Peña & Linde-Forsberg* (2000) infatti, la diluizione 1:4 ha registrato i valori più bassi di motilità progressiva immediatamente dopo lo scongelamento anche se ha migliorato la longevità delle cellule rispetto alle diluizioni minori [43].

1.6.3 Danno ossidativo

La produzione di energia attraverso la via aerobica implica la produzione di piccoli quantitativi di forme reattive dell'ossigeno (ROS: *reactive oxygen species*) che si formano durante le normali reazioni di ossido-riduzione della respirazione cellulare, ma anche metalli di transizione liberi come il Fe^{2+} e il Cu^+ possono catalizzarne la produzione. Le specie reattive vengono mantenute a livelli fisiologici dai naturali meccanismi di difesa cellulari. L'accumulo di ROS, causa dello stress ossidativo, è il risultato di uno squilibrio tra i sistemi di produzione e di eliminazione dei radicali [2,38]. Gli effetti dell'accumulo di ROS sono principalmente tre:

- Perossidazione lipidica delle membrane: il danno inizia a carico dei doppi legami degli acidi grassi insaturi con la formazione di perossidi, sostanze molto instabili e reattive che inducono una reazione a catena autocatalitica;
- Alterazioni ossidative a carico delle proteine: ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi, formazione di legami crociati proteine-proteine e frammentazioni della catena proteica;
- Danni al DNA: legami tra le basi e rotture dei filamenti [38];

E' stata dimostrata un'associazione tra il danno ossidativo e la criopreservazione poiché essa stessa è una causa della produzione eccessiva di ROS [30]. L'aumentata produzione di ROS è stata associata alla riduzione della motilità, alla ridotta capacità di fusione con l'oocita e all'infertilità [7,17,30,35]. Le specie reattive più comuni sono l'anione superossido, il perossido d'idrogeno, i radicali perossidi e idrossilici, l'ossido nitrico e l'anione perossinitrico [17]. Il perossido d'idrogeno è una specie radicale molto reattiva e un potente iniziatore della perossidazione lipidica [6] ed è considerato la specie reattiva più tossica a causa della sua capacità di attraversare facilmente e rapidamente le membrane, di inibire le attività enzimatiche e le funzioni cellulari. La sua tossicità è causata dall'attivazione dell'enzima glutatione perossidasi/reduccasi [9]. La catalasi è l'enzima d'elezione nella protezione della cellula da questa specie reattiva [6,9,35,41]. Nell'eiaculato umano i radicali dell'ossigeno vengono prodotti dagli spermatozoi stessi e dai leucociti eventualmente presenti ed è stato

confermato essere così anche nel toro, nel topo e nel coniglio [7,9,40], per cui si può ipotizzare un processo analogo anche nel cavallo. Essendo il plasma seminale un'importante fonte di sostanze antiossidanti, una volta che questo viene eliminato il materiale seminale diventa più vulnerabile agli effetti tossici delle ROS [7,9].

La perossidazione lipidica è la diretta conseguenza della presenza di eccessive specie reattive dell'ossigeno e si esplica a livello degli acidi grassi insaturi delle membrane. La regione di membrana cellulare più colpita è risultata essere quella centrale (*mid piece*) e le restanti regioni vengono progressivamente colpite all'aumentare della quantità di specie reattive, risparmiando però la membrana acrosomiale [9]. La maggiore sensibilità della regione centrale si spiega ricordando che è quella che contiene i mitocondri dello spermatozoo ed è quindi ricca di ossigeno e dei suoi derivati [9]. Le cellule scongelate si sono rivelate più sensibili all'ossidazione rispetto a cellule non congelate, perché lo stesso grado di ossidazione viene raggiunto a concentrazioni di ROS inferiori [9]. Questo può essere dovuto all'eliminazione del plasma seminale che riduce di molto le risorse antiossidanti naturali del seme [7,9]. Il danno ai fosfolipidi causa un aumento della permeabilità di membrana con perdita dell'equilibrio osmotico ed elettrolitico (aumento intracellulare di Na^+ e di Ca^{2+} e riduzione intracellulare di K^+) [14]. Può causare anche la distruzione diretta o l'inattivazione di enzimi (per ossidazione delle proteine), in particolar modo degli enzimi acrosomiali, alterazioni a carico del citoscheletro e dell'assonema [41] e danneggiare il DNA [30]. Infatti la perossidazione del DNA può portare alla formazione di legami crociati, sostituzione di basi o addirittura alla rottura di porzioni di DNA [6]. L'ossidazione dei gruppi SH (tioli) delle proteine è stata associata all'inibizione della motilità e della capacità fecondante (fusione delle membrane e penetrazione nell'ocita) [8,40] e in un altro lavoro l'aggiunta dei tioli nel diluente ha peggiorato la motilità spermatica del seme congelato di bovino [35]. La perossidazione lipidica è stata associata a reazioni acrosomiali anomale e perdita della fluidità di membrana con riduzione della motilità e del potenziale di fertilizzazione degli spermatozoi [2]. Questi danni ossidativi causano anche un'importante alterazione del metabolismo cellulare, tra cui ad esempio una riduzione dei livelli di ATP, che porta a un'irreversibile perdita di motilità, vitalità e quindi di capacità fecondante [16]. Mentre la perdita di vitalità delle cellule spermatiche è stata osservata solo a concentrazioni molto elevate di t-BUT (a 10 mM di *tert-butylhydrogen peroxide*, un analogo del perossido lipidico),

la motilità viene inibita anche solo da aumenti progressivi della perossidazione lipidica delle membrane indotta dal perossido d'idrogeno [9]. Così *Baumber et al.* nel 2000 ipotizzarono che la motilità fosse un parametro più sensibile della vitalità, dell'integrità acrosomiale, della perossidazione lipidica e del potenziale di membrana mitocondriale [9]. La sensibilità degli spermatozoi al danno ossidativo è da attribuire all'elevata concentrazione di acidi grassi insaturi presenti nelle membrane cellulari, alla quasi completa dipendenza dal metabolismo aerobico per la produzione di ATP (e quindi produzione di radicali nei mitocondri), alle ridotte difese antiossidanti, all'incapacità di riparare i danni cellulari perché non avviene più la trascrizione genica e alla produzione di ROS da parte degli spermatozoi stessi [2,8].

Gli effetti causati dalle specie reattive dell'ossigeno dipendono dalla loro natura, quantità, momento e durata dell'esposizione [9]. La produzione controllata di ROS da parte degli spermatozoi ha una funzione di controllo e di mediatore di eventi fisiologici come la capacitazione, l'iperattivazione, la reazione acrosomiale e la fusione oocita-spermatozoo [2,9,39,40], per cui lo scopo dell'aggiunta di antiossidanti non deve essere quello di eliminare completamente le specie reattive, ma quello di mantenerle a livelli fisiologici [35]. Una quantità eccessiva di ROS invece è tossica per la cellula spermatica; può essere dovuta alla deplezione o all'inefficienza dei meccanismi di controllo enzimatici, può essere causata dalla presenza di troppi spermatozoi difettosi o danneggiati, o da leucociti presenti nel materiale seminale [6,7,16]. La produzione endogena di ROS può essere aumentata anche dal processo di congelamento e scongelamento del seme in sé e la frammentazione nucleare progredisce in modo lineare con il numero dei cicli di congelamento-scongelamento [6]. Il danno al DNA da parte delle specie reattive dell'ossigeno avviene molto prima di qualsiasi alterazione visibile nella fusione sperma-oocita o nella motilità, e consiste nella formazione di nuovi legami (*cross-linking*), nella frammentazione e nello scambio di basi della sequenza genica ed è causato dalla perossidazione lipidica [6]. Alcuni fattori possono incrementare lo stato ossidativo delle cellule durante la loro criopreservazione:

- Il rapporto di diluizione;
- La disponibilità di ossigeno durante la lavorazione del seme;
- La presenza di molti spermatozoi morti, danneggiati, immaturi o di leucociti;
- La centrifugazione e l'asportazione del plasma seminale;

- L'eccessivo ingresso di Ca^{2+} nella cellula, soprattutto con diluitori a base di latte (il Ca^{2+} favorisce la produzione di H_2O_2 e la capacitazione prematura);
- La riduzione delle difese antiossidanti nel seme diluito con diluitori a base di tuorlo d'uovo [8];

Anche sostanze come l'ergotioneina (più abbondante nel cavallo che nel bovino), la cisteina e il glutathione possono contribuire a limitare il danno ossidativo.

2 Obiettivi

Il principale limite dell'inseminazione artificiale con seme congelato è la ridotta vitalità e capacità fecondante residua degli spermatozoi dopo lo scongelamento, che spesso non raggiunge il valore minimo di 35% spermatozoi progressivamente motili, standard stabilito dalla WBFSH (*world breeding federation for sport horses*) [18]. Vari fattori possono determinare la qualità finale del materiale seminale post scongelamento fra cui, caratteristiche soggettive, differenza fra eiaculati di uno stesso stallone e metodica di congelamento. Nessuno di questi parametri può essere modificato dall'utilizzatore finale, che però ha il massimo interesse ad ottenere alte percentuali di gravidanza. L'obiettivo del lavoro è di valutare se vi sia un protocollo di scongelamento che possa massimizzare la motilità residua del materiale seminale e garantirne la sopravvivenza per tutto il tempo necessario affinché gli spermatozoi possano raggiungere le tube e fecondare l'oocita. Il protocollo oggetto di questo lavoro intende valutare l'effetto della diluizione del seme post scongelamento con l'*extender Equipro™*, con e senza l'aggiunta dell'antiossidante α tocoferolo, sulla qualità e durata della motilità degli spermatozoi.

3 Materiali e metodi

Per lo svolgimento del lavoro è stato utilizzato il seme congelato di 13 stalloni da sella, di diverse razze, messo a disposizione dal Centro Stalloni Intermizoo di Vigonza (PD). Il lavoro si è svolto presso il Centro Tori Intermizoo di S. Donà di Piave. La scelta degli stalloni è stata randomizzata sulla base della disponibilità di materiale seminale congelato.

Per ogni stallone sono state scongelate tre *paillettes* appartenenti a tre lotti di produzione diversi. Il seme dopo scongelamento in bagno riscaldato a 37°C è stato diviso in tre aliquote:

1. TQ: seme scongelato tal quale
2. TE: 300 µl di seme tal quale addizionato a 300 µl di Equipro™ (Minitüb)
3. TA: 300 µl di seme tal quale addizionato a 300 µl di Equipro™ (TE) con l'aggiunta di 200 µg/ml di α Tocoferolo (Sigma-Aldrich®)

Per ogni tesi sono state effettuate tre ripetizioni al fine di ridurre statisticamente l'errore. I 117 campioni sono stati quindi valutati allo scongelamento (T_0), e a 1,5, 3, 4,5, 6 ore post scongelamento per un totale di 585 analisi. I campioni sono stati mantenuti nell'acqua a 37°C per l'intera durata della prova.

Il seme è stato analizzato tramite il dispositivo computerizzato CASA (*computerized assisted sperm analyzer*) della HAMILTON THORNE BIOSCIENCES (IVOS, Animal Version 12.3D Bild 002) con il seguente settaggio:

- *Minimum cell size* 4 pixel
- 30 *frames* con frequenza 60 Hz (acquisizione di 30 *frames* al secondo, frequenza minima di fotogrammi necessari per garantire una precisa valutazione della motilità spermatica [11,13])
- Contrasto minimo 45

Per le cellule progressivamente motili:

- VAP 25 μ/s
- STR *threshold* 80%

Per le cellule poco o non motili:

- VSL *cutoff* inferiore 20 μ/s
- VAP *cutoff* inferiore 24,9 μ/s
-

In campi con meno di cinque cellule motili:

- Cell size 13 pixel
- Cell intensity 25

I parametri misurati dallo strumenti sono stati: motilità (MOT), spermatozoi progressivamente motili (PMS= *progressive motile spermatozoa*), velocità media (VAP), velocità rettilinea (VSL), velocità curvilinea (VCL), rettilineità (STR), linearità (LIN) e spostamento medio della testa (ALH).

Il settaggio utilizzato era quello standardizzato per l'analisi del materiale seminale equino.

La valutazione del seme avveniva sempre nello stesso ordine di scongelamento, a intervalli di un'ora e mezza dallo scongelamento, per un totale di sei ore di osservazione e cinque tempi (tempo 0, 1,5, 3, 4,5 e 6 ore).

Con una micropipettatrice veniva prelevata una goccia di seme dalla provetta e posta su un vetrino riscaldato Cell-VU con due camere di conta. L'osservazione avveniva a un'ingrandimento di 10X e di ogni campione venivano analizzati dieci campi alla volta. I campi venivano selezionati manualmente cercando di evitare quelli che presentavano bolle d'aria o troppe impurità. Solo il seme dello stallone *Campione* ha richiesto diluizioni di 1:2 o 1:3 a causa della alta concentrazione del TQ da impedire al dispositivo l'analisi dei campi selezionati.

Per le analisi statistiche i dati sono stati elaborati utilizzando un modello lineare misto con l'effetto casuale dello stallone (al fine di eliminare la possibile variabilità individuale) e per dati ripetuti nel tempo. La PROC MIXED del SAS è stata utilizzata a questo scopo con i seguenti fattori fissi di analisi:

Tesi (3 livelli), Ora di rilievo dallo scongelamento (5 livelli), Interazione Tesi per Ora e Ripetizione (3 livelli). I gradi di libertà dell'interazione (8) sono stati scomposti nei seguenti dieci confronti non ortogonali:

- TQ vs. TA+TE a ore 0, 1,5, 3, 4,5 e 6;
- TA vs. TE a ore 0, 1,5, 3, 4,5 e 6.

4 Risultati e discussione

4.1 Quadro generale

Per tutti i tredici stalloni, per le tre tesi e le tre ripetizioni alle ore 1,5, 3, 4,5 e 6 post scongelamento (585 osservazioni in totale) è stata calcolata la media di ogni parametro considerato: la motilità (MOT), gli spermatozoi progressivamente motili (PMS), la velocità media (VAP), la velocità rettilinea (VSL), la velocità curvilinea (VCL), la rettilineità (STR), la linearità (LIN) e lo spostamento medio della testa (ALH). Da tali dati si è poi potuto procedere con un'accurata inferenza statistica.

A T_0 i parametri che meglio hanno risentito della diluizione sono stati i PMS (+17.2%), la LIN (+9.9%) e la STR (+3.7%), mentre sono peggiorati in seguito a diluizione la VAP (-0.84%), l'ALH (-10.9%) e la VCL (-5.8%). La VAP e la VCL delle tesi diluite sono migliorate al passare del tempo fino a raggiungere una differenza positiva tra TA e TQ, i valori di ALH si sono attestati su valori simili per tutte e tre le tesi, mentre la STR e la LIN delle tesi diluite sono peggiorate di più rispetto a TQ. Questi due tipi di parametri (VAP e VCL contro STR e LIN) sono inversamente correlati. Appena scongelati, gli spermatozoi producono energia sufficiente per mantenere il movimento lineare necessario per raggiungere il più rapidamente possibile l'oocita e con il passare delle ore la linearità si perde per lasciare il posto a un movimento sempre più circolare fino alla perdita completa della motilità lineare.

4.2 Motilità totale e progressivamente lineare

Nella tabella 4.1 sono riportate le medie e le deviazioni standard per ogni stallone di MOT e PMS delle tre tesi e delle tre ripetizioni per tesi rilevate subito dopo lo scongelamento (ora 0).

STALLONE	MOT %		PMS %	
	Media	d.s.	Media	d.s.
CAMPIONE	47.2	6.4	34.6	6.2
CANDIDAT	5.2	3.6	2.7	1.9
CENTOFIORI	36.7	8.7	27.1	5.5
CODEAU	53.7	12.3	39.7	10.7
CORGRAF	25.7	4.6	21.0	4.2
CORIANDER	59.9	6.4	46.3	7.3
GOODWIL	22.7	9.8	19.4	7.8
LAYL	65.9	8.8	41.4	6.7
LORDMARCO	43.7	10.6	33.1	7.8
NATAL	43.1	10.1	34.7	8.4
ORBY	38.4	10.8	31.7	10.3
SIRIUS	58.7	10.7	49.6	9.5
VIALLY	61.3	12.8	43.7	10.3

Tab.4.1: medie e deviazioni standard ottenute da nove dati (tre tesi X tre ripetizioni) di %MOT e %PMS

Da questa tabella si può notare come il campione, nonostante sia costituito da soli tredici soggetti, sia vario e significativo, poiché comprende grande variabilità nella qualità del materiale seminale. Questo *pool* di soggetti è rappresentativo delle condizioni di mercato, le quali offrono agli allevatori seme con qualità e quantità della dose inseminante molto diverse tra loro. Il seme con percentuale di motilità inferiore è stato quello di *Candidat*, evidenziato in giallo, con 5.2% di MOT; i soggetti migliori sono stati *Layl*, *Codeau*, *Coriander*, *Sirius* e *Vially*, evidenziati in verde, con percentuali di MOT superiori al 50%; *Goodwil* e *Corgraf* invece, evidenziati in arancione, sono soggetti di scarsa-media qualità con una percentuale di MOT compresa tra 20% e 25%. Il seme con percentuale di PMS minore

appartiene a *Candidat*, con 2.7% di PMS; i soggetti migliori hanno mostrato valori superiori a 39.7% di PMS mentre i soggetti di qualità media-scarso hanno valori intorno al 20% di PMS. La WBFSH pone lo standard qualitativo a 35% come valore minimo di PMS post scongelamento al momento dell'inseminazione [18]. La MOT media post scongelamento di tutti i soggetti è del 43.24 % \pm 19.14% d.s. e la PMS media è del 32.68% \pm 14.42% d.s.. Osservando la tabella 4.1 solo sei soggetti non raggiungono lo standard della WBFSH, mentre due soggetti sono molto vicini al 35%. La presenza di stalloni che non raggiungono gli standard qualitativi è dovuta al fatto che attualmente, la selezione dei riproduttori viene fatta sulla base delle *performance* sportive e non su parametri oggettivi della qualità seminale. Bisogna inoltre tenere conto delle differenze soggettive del seme nella risposta al congelamento. Esistono infatti stalloni considerati *good freezer* e stalloni considerati invece *bad freezer* in base alla loro minore o maggiore sensibilità allo *shock* da freddo, che sembra dipendere dalle differenze nel contenuto di colesterolo nella membrana cellulare [26,27] e quindi anche la motilità post scongelamento è infine influenzata dal fattore individualità [3,19]. Per questo motivo si è deciso di non scartare gli stalloni più scadenti ma di mantenere la loro variabilità. Bisogna inoltre anche ricordare che fino ad oggi non esiste un test valido per correlare concretamente la qualità del seme con la sua effettiva fertilità. Il rispetto dei valori di motilità e di concentrazione minimi imposti dalla WBFSH dovrebbe garantire agli allevatori l'acquisto di materiale seminale di qualità certificata e garantita [18], anche se ad oggi non vi sono limitazioni al commercio di materiale seminale non rispondente alle caratteristiche minime suggerite.

Sempre nella tabella 4.1 si può notare come la deviazione standard sia generalmente bassa e in particolare tende ad attestarsi su valori più bassi nei soggetti con ridotta motilità e su valori invece più alti nei soggetti con elevata motilità. Tale andamento si può spiegare in termini probabilistici, poiché un seme con maggiore motilità avrà maggiore probabilità di avere valori di motilità anche molto diversi tra di loro e quindi una deviazione standard più elevata. Infatti, il seme dello stallone *Vially* ha valori di motilità che variano da 48.5% a 74.1% (d.s. 12.8%), mentre per lo stallone *Candidat* la variabilità va da 1.6% a 8.8% (d.s. 3.6%).

Il diagramma 4.1 offre una visualizzazione più immediata degli stessi valori di MOT e di PMS della tabella 4.1. Si può osservare ancora meglio come la popolazione scelta per lo studio comprenda materiale seminale di qualità molto variabile, con un intervallo che varia da 5.2% di *Candidat* a 65.9% di *Layl* (campo di variazione uguale a 41.1 %) per la MOT e per i PMS da 2.7% di *Candidat* a 49.6% di *Sirius* (campo di variazione uguale a 27.4%).

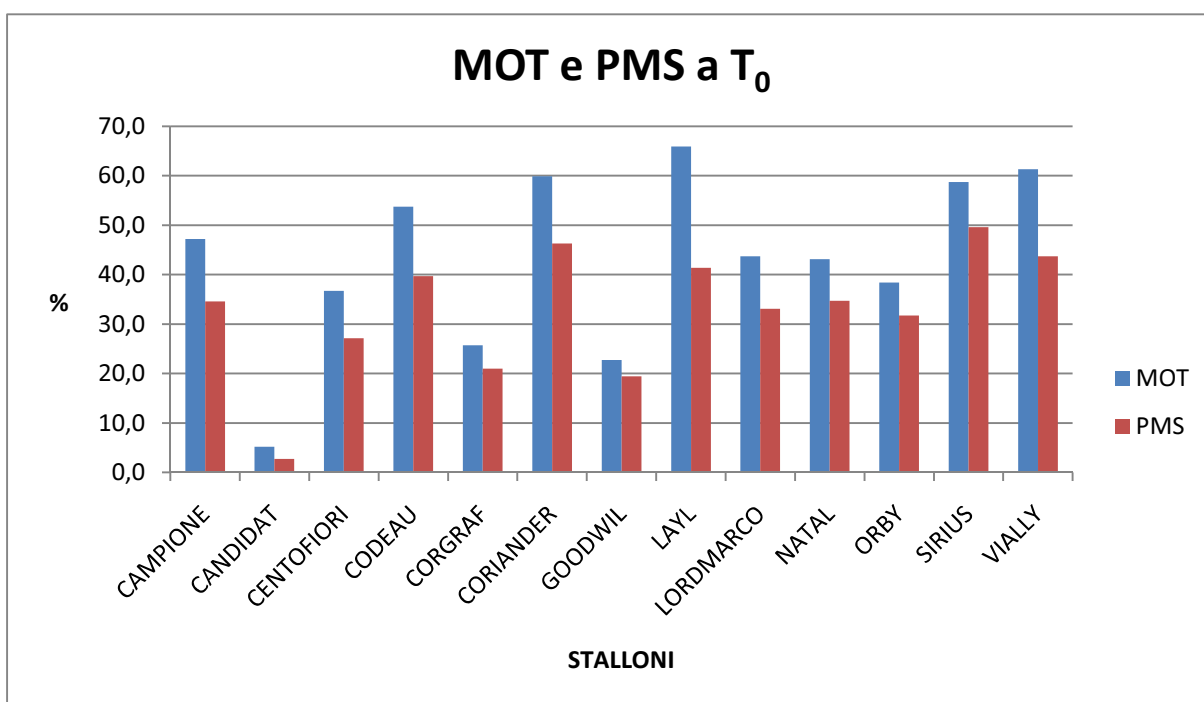


Diagramma 4.1: panoramica di motilità totale e lineare dei tredici stalloni a T_0

Il diagramma 4.2 riporta la media totale di PMS e di MOT di ogni trattamento allo scongelamento. Si può osservare come tali valori si discostino poco tra di loro a T_0 , tranne il valore di TQ dei PMS che differisce di più rispetto agli altri. La diluizione del seme con il mestruo diluente *EquiproTM* e l' α tocoferolo allo scongelamento ha migliorato la MOT dell'1.6% e i PMS del 17.2% rispetto al TQ.

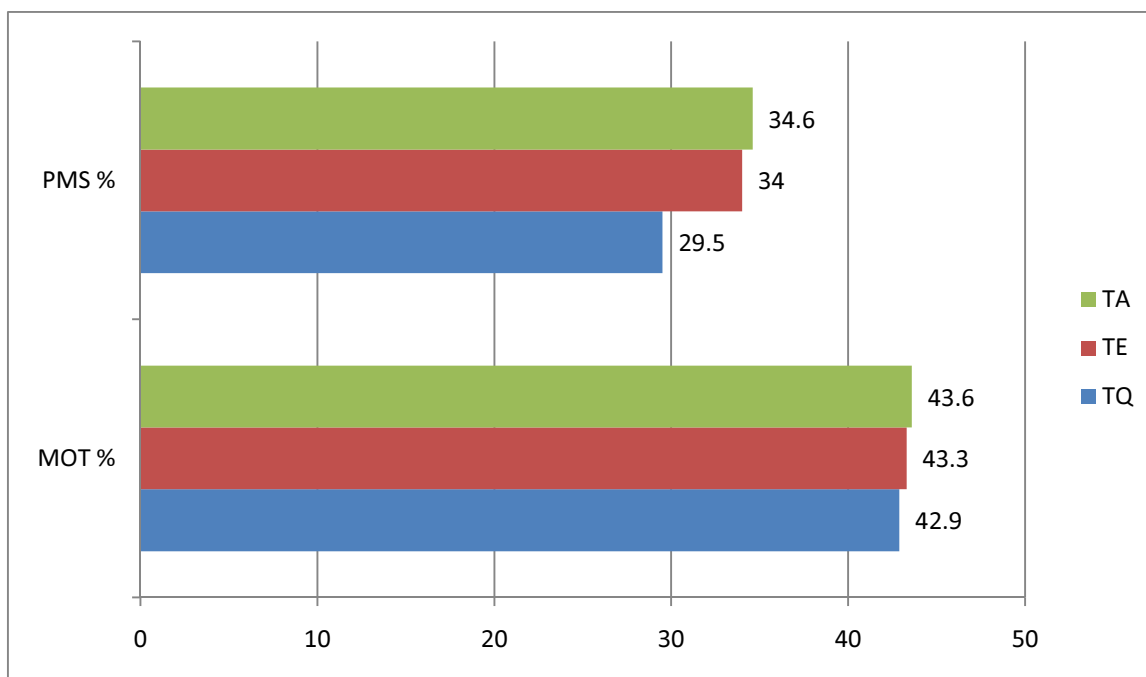


Diagramma 4.2: medie di PMS e MOT a T_0

4.3 Analisi della varianza e confronti

Le tabelle 4.2 e 4.3 sono tabelle di analisi della varianza (ANOVA) e mostrano sinteticamente l'effetto che ogni variabile considerata ha sulla variabilità dei dati ottenuti. Il valore F è il risultato del rapporto della varianza tra gruppi (dovuta ai trattamenti) con la varianza entro gruppi (dovuta all'errore, il residuo; calcolata in questo caso anche con l'effetto stallone). Se il rapporto supera un valore di F cosiddetto critico, l'ipotesi nulla, cioè l'ipotesi che la variabilità dei dati è dovuta al caso, è rifiutata e anzi, il valore è statisticamente significativo.

Effetto	MOT %		PMS %		VAP		VSL	
	F	P	F	P	F	P	F	P
TESI	13.72	***	21.65	***	18.09	***	21.96	***
ORA	270.4		260.8		102.6		118.4	
TESI*ORA	8	***	1	***	9	***	6	***
RIPETIZIONE	1.30	n.s.	0.72	n.s.	2.48	*	1.78	n.s.
	1.08	n.s.	1.76	n.s.	1.22	n.s.	1.74	n.s.

Tab. 4.2: Analisi della varianza; n.s.: non significativo; $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$;

Effetto	VCL		STR		LIN		ALH	
	F	P	F	P	F	P	F	P
TESI	7.82	***	1.42	n.s.	6.09	***	2.95	n.s.
ORA	79.50	***	9.41	***	6.33	***	0.59	n.s.
TESI*ORA	3.04	***	1.49	n.s.	4.00	***	0.88	n.s.
RIPETIZIONE	1.21	n.s.	1.97	n.s.	4.30	*	0.27	n.s.

Tab. 4.3: Analisi della varianza; n.s.: non significativo; $P>0.05$; * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$;

L'effetto della tesi (TQ, TE e TA) è molto significativo per tutti i parametri ad esclusione della rettilineità (STR) e dell'ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH). L'effetto dell'ora di osservazione è stato molto significativo per tutti i parametri, eccetto per ALH. L'effetto combinato di tesi*ora è stato molto significativo solo per la velocità curvilinea (VCL) e per la linearità (LIN), poco significativo per la velocità media (VAP) e non significativo per tutti gli altri parametri. L'effetto della ripetizione si è dimostrato significativo solo per il parametro LIN. A dimostrazione della validità dello studio, fare più ripetizioni è utile per ridurre l'errore ed annullare le variabilità del singolo campione sull'intera prova (l'effetto stallone). Dalla tabella 4.3 si può vedere come il valore di ALH non abbia mai risentito né positivamente, né negativamente dell'aggiunta di *Equipro*TM o di *Equipro*TM+ α tocoferolo,

mostrando solo un lieve peggioramento del valore nel tempo ma senza significatività. Solo nel contrasto TE+TAvsTQ all'ora 0 ha mostrato significatività (grafico 4.9).

I parametri di movimento si sono comportati in modo variabile. Il parametro STR non ha dimostrato un miglioramento significativo rispetto agli altri parametri, l'ora è stato l'unico fattore che l'ha influenzato. La STR è un parametro infatti, il cui peggioramento dipende molto dal tempo trascorso. All'ora 0 l'interazione TE+TAvsTQ aveva una rettilineità del 3.2% migliore rispetto al TQ (grafico 4.7). Il peggioramento del parametro nelle ore successive è dovuto alla perdita progressiva del movimento lineare a favore di quello circolare. Il parametro LIN ha risentito in modo positivo dell'effetto tesi, ora e della combinazione tesi*ora, in modo particolare la differenza è stata tangibile (circa del 18.8%, tabella 4.4) confrontando TA e TE con TQ, in quanto TA ha mostrato valori molto simili a TE. Anche VCL ha risentito in modo positivo dell'effetto tesi, dell'ora e della combinazione tesi*ora. I valori di questo parametro erano più elevati in TE+TA rispetto a TQ in ogni momento dell'osservazione tranne all'ora 1,5 (grafico 4.6). La velocità rettilinea (VSL) ha risentito in modo positivo dell'effetto della tesi e dell'ora. Infatti sia TE, TA sia la combinazione delle due tesi presentano valori migliori rispetto a TQ e questo *trend* si è mantenuto costante per tutta la durata dell'osservazione. Per VAP l'effetto della tesi e dell'ora sono risultati i più significativi. In modo particolare la combinazione TA+TE rispetto a TQ aveva valori più alti all'ora 1,5, 3 e 4,5 dell'8.5 %, 8.8 % e del 7 % rispettivamente. Ma i parametri più importanti di questo lavoro sono la motilità totale (MOT) e progressiva (PMS) e in modo particolare sono interessanti i valori all'ora 3 e 4,5 perché questo è all'incirca il tempo impiegato dagli spermatozoi per raggiungere le tube una volta depositati nelle vie genitali femminili. Entrambi i parametri hanno risentito positivamente dell'effetto della tesi e dell'ora ma non della loro combinazione. Per la MOT, particolarmente significativo è stato il contrasto tra TA+TE e TQ all'ora 1,5 e 3 con valori di circa 7% più alti rispetto a TQ. Il crollo dei valori di motilità si è osservato avvenire tra l'ora 3 e 4,5 post scongelamento, in questo intervallo di tempo infatti si ha una perdita del 62% degli spermatozoi motili. I PMS invece hanno mostrato valori migliori già dallo scongelamento fino all'ora 4,5 (con un Delta positivo (Te+TA)-TQ compreso tra 3,1% e 6.7%) con il valore più elevato (Delta= 6.7%) all'ora 1,5. Dall'ora 1,5 all'ora 3 il valore diminuisce del 24%, per diminuire di un ulteriore 74% dall'ora 3 all'ora 4,5. Entrambi erano simili a TQ alla sesta ora.

Medie T₀	TQ	TE	TA	Contrasti	TEvsTQ	TAvsTQ	TEvsTA	Te+TA vs TQ
MOT %	42.9	43.3	43.6		4.11**	4.87***	0.59	26.85***
PMS %	29.5	34.0	34.6		5.14***	6.13***	0.98	42.31***
VAP	82.9	82.8	82.2		5.70***	4.51***	1.42	34.75***
VSL	69.4	72.1	71.6		6.18***	5.16***	1.05	42.86***
VCL	152.4	143.7	143.5		3.74**	2.98*	0.59	15.06***
STR	83.5	86.8	86.6		0.92	1.68	0.58	2.25
LIN	47.1	52.2	51.8		3.06*	2.99*	0	18.8**
ALH	5.5	5.0	4.9		-2.22	-1.95	0.07	5.82*

Tab. 4.4: Medie stimate e contrasti delle tre tesi a confronto di ogni parametro

La tabella 4.4 nella parte di sinistra riassume i valori medi di ogni parametro per ogni tesi a T₀, mentre nella parte di destra mostra il valore e il grado di significatività dei contrasti calcolati all'ora 0. Solo il contrasto tra TE e TA non ha mostrato significatività. Il contrasto tra TE e TQ e tra TA e TQ ha mostrato discreta significatività, ma i valori più elevati si sono ottenuti sommando TE con TA e confrontando la somma con TQ. Questo risultato suggerisce che la diluizione, in generale, con o senza antiossidante, del seme scongelato ne rallenta il decadimento a cui va incontro normalmente, migliorandone le prestazioni e aumentando la probabilità di fecondazione dell'oocita. In modo particolare, i parametri che meglio hanno reagito sono stati MOT, PMS, VAP, VSL e VCL.

4.4 Analisi dei singoli parametri di movimento

Di seguito vengono riportate le tabelle (tab. 4.5 – tab. 4.12) e le relative curve di decadimento (grafico 4.2 – grafico 4.9), che riportano anche il valore e il grado di significatività del contrasto TE+TAvsTQ, delle medie di ogni parametro a ogni ora di osservazione.

MOT%

Ora	TQ	TE (<i>Equipro</i> TM)	TA (<i>Equipro</i> TM + α tocoferolo)
0	42.9	43.3	43.6
1,5	23.8	29.6	32.7
3	12.3	20.2	18.7
4,5	6.5	10.1	11.4
6	4	7.1	7.8

Tab.4.5: % di MOT per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

Si può immediatamente notare come subito dopo lo scongelamento la diluizione del seme non ne ha modificato la motilità, ma l'effetto positivo si è palesato dopo 1,5 ore e si è mantenuto fino a 4,5 ore dopo. Alla sesta ora l'effetto della diluizione non risulta più statisticamente significativo.

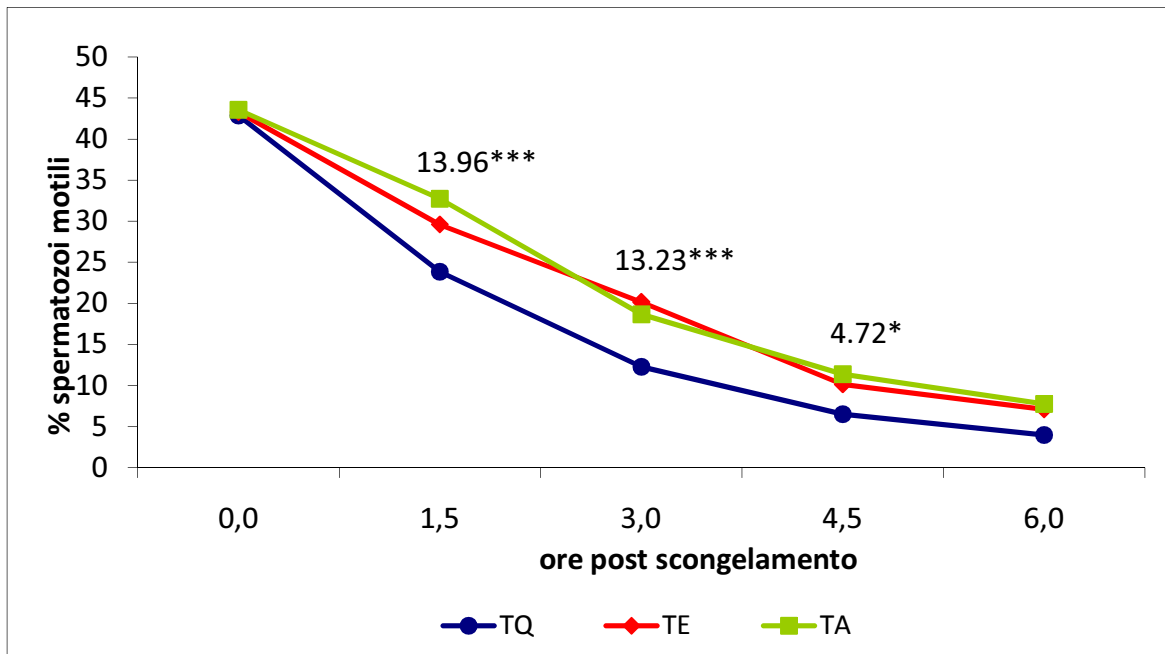


Grafico 4.2: curve di decadimento della MOT nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

PMS %

Ora	TQ	TE (<i>Equipro</i> TM)	TA (<i>Equipro</i> TM + α tocoferolo)
0	29.5	34	34.6
1,5	16.7	22.3	24.5
3	8.3	14	13.4
4,5	4	6.5	7.7
6	2.3	4.7	5.3

Tab. 4.6: % di PMS per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

Nel caso dei PMS l'effetto positivo della diluizione è stato evidente già a T_0 , ma ha raggiunto il valore massimo dopo 1,5 ore come avvenuto per la MOT. Il risultato positivo si può interpretare dicendo che la diluizione ha reso progressivamente lineari spermatozoi che avevano un movimento circolare o poco lineare. Alla terza ora, quella che più interessa per la fecondazione, il miglioramento della motilità progressiva è ancora molto significativo.

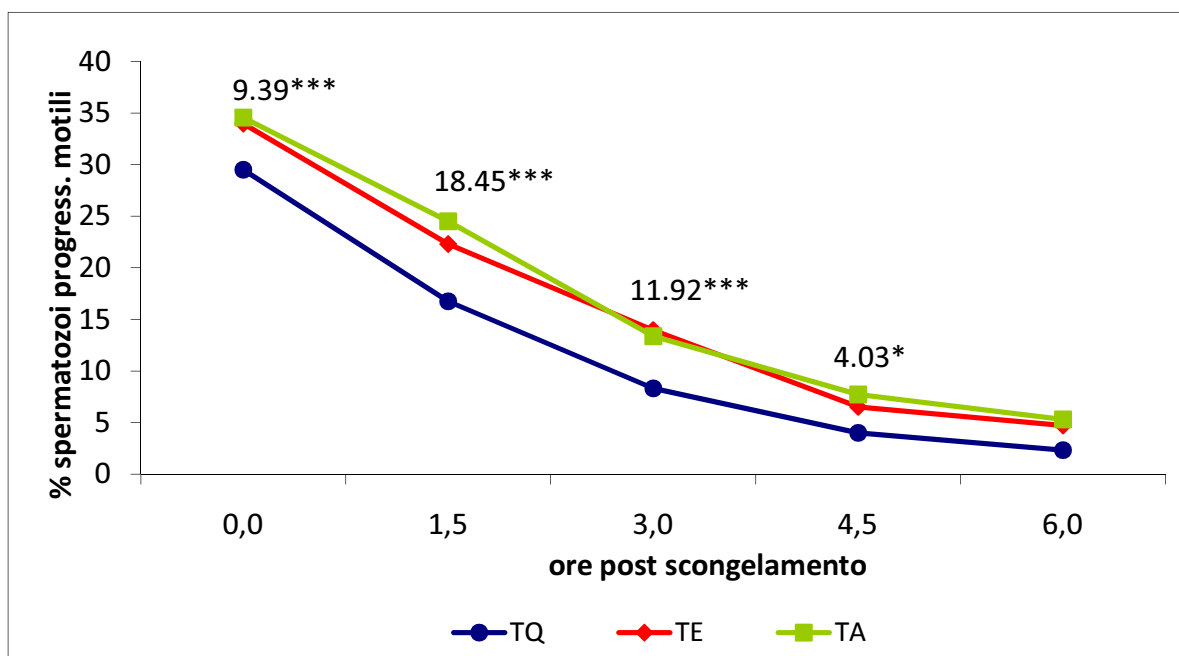


Grafico 4.3: curve di decadimento della PMS nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

VAP

Ora	TQ	TE (<i>Equipro</i> TM)	TA (<i>Equipro</i> TM + α tocoferolo)
0	82,87	82,75	82,18
1,5	67,46	76,18	75,65
3	60,42	70,00	68,43
4,5	56,83	62,73	64,83
6	55,28	61,71	55,90

Tab. 4.7: % di VAP per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

La curva della VAP decade in modo più lineare rispetto alla MOT e ai PMS, e tende ad assumere un andamento di *plateau* verso la sesta ora. La diluizione con *Equipro*TM con o senza α tocoferolo aumenta la velocità media rispetto al TQ ma alla sesta ora c'è una sorprendente differenza significativa tra TA e TE, non evidenziata nei precedenti confronti. Il TA si porta a valori simili a quelli di TQ perdendo l'effetto positivo.

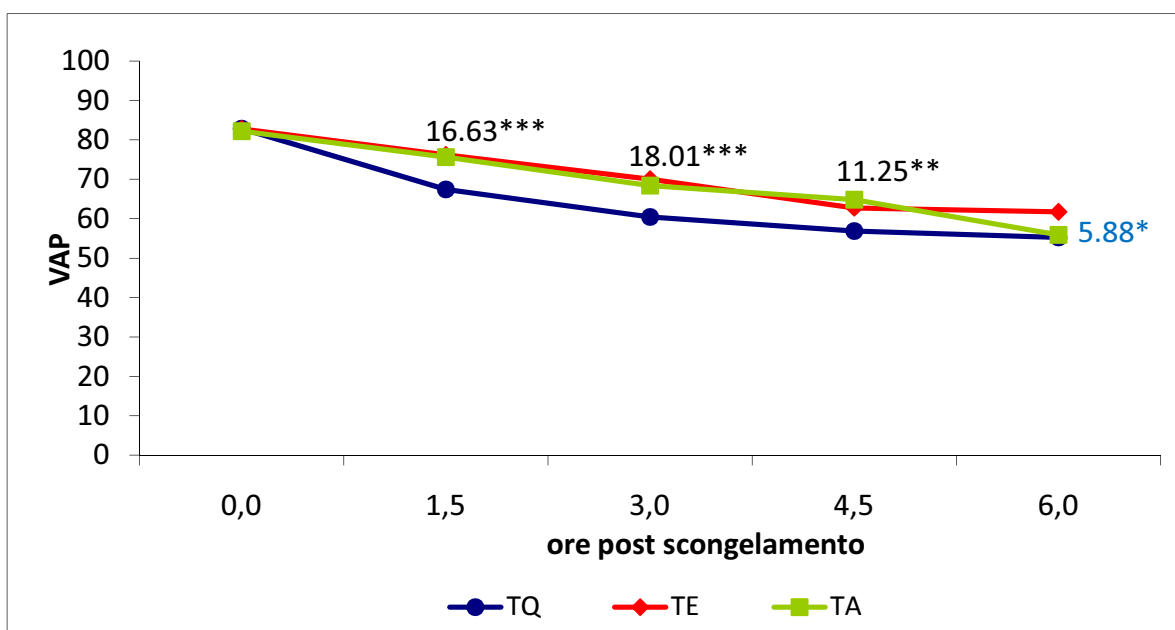


Grafico 4.4: curve di decadimento della VAP nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

VSL

Ora	TQ	TE (Equipro TM)	TA (Equipro TM + α tocoferolo)
0	69.36	72.09	71.63
1,5	56.31	64.92	64.47
3	49.84	57.67	56.75
4,5	46.65	51.32	53.40
6	45.80	51.24	46.13

Tab. 4.8: % di VSL per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

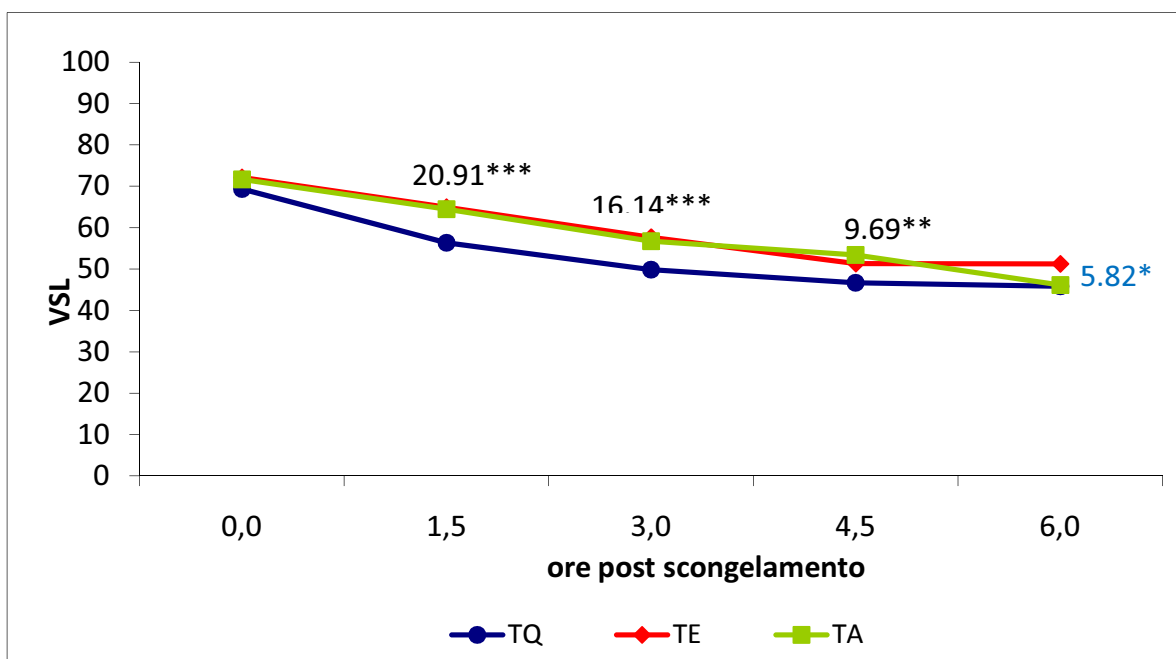


Grafico 4.5: curve di decadimento della VSL nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

La curva della VSL è molto simile a quella della VAP. Le due curve si assomigliano nell'andamento, nell'insorgenza dell'effetto positivo 1,5 ore dopo lo scongelamento e nella presenza di una differenza significativa tra TE e TA alla sesta ora. Anche in questo caso è il TA a perdere il proprio effetto benefico. Tra gli ultimi due parametri considerati, la VSL ha

dimostrato un maggiore miglioramento rispetto alla VAP all'ora 1,5, ma i valori della VAP sono più elevati dei valori della VSL all'ora 3 e 4,5 perché con il passare del tempo aumenta la quota di spermatozoi con un movimento circolare.

VCL

Ora	TQ	TE (Equipro TM)	TA (Equipro TM + α tocoferolo)
0	152.37	143.70	143.47
1,5	130.59	138.21	136.92
3	119.47	131.15	129.65
4,5	110.19	120.66	122.47
6	99.33	113.54	107.52

Tab. 4.9: % di VCL per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

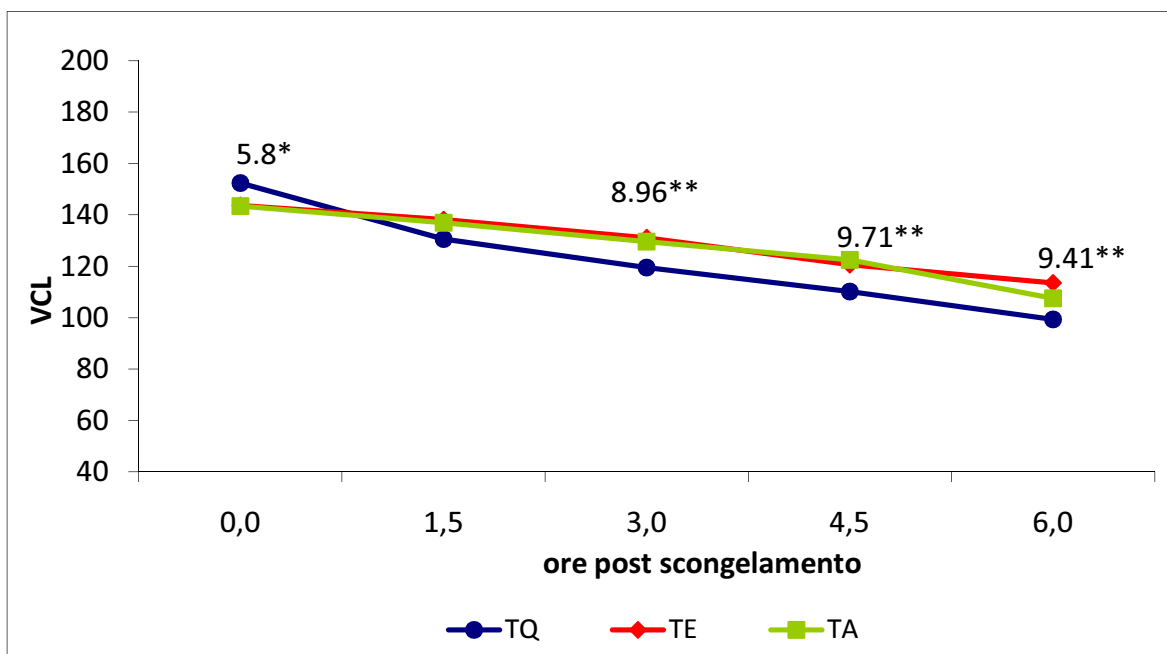


Grafico 4.6: curve di decadimento della VCL nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

La VCL si è comportata in maniera differente rispetto agli altri parametri. Allo scongelamento il TQ aveva una VCL più alta rispetto a TE+TA. Dopo di che la VCL del TQ è tornata a livelli

inferiori rispetto a TE+TA fino ad assumere significatività dalla terza ora in poi. E' auspicabile che la diluizione riduca i valori della VCL perché significa che favorisce un movimento più lineare rispetto a quello circolare rappresentato dalla VCL. Questo effetto positivo si è esplicito solo fino all'ora 1,5.

STR

Ora	TQ	TE (<i>Equipro</i> TM)	TA (<i>Equipro</i> TM + α tocoferolo)
0	83.49	86.85	86.56
1,5	83.69	86.10	85.87
3	82.64	83.79	83.92
4,5	82.05	80.36	82.95
6	82.67	80.59	81.00

Tab. 4.10: % di STR per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

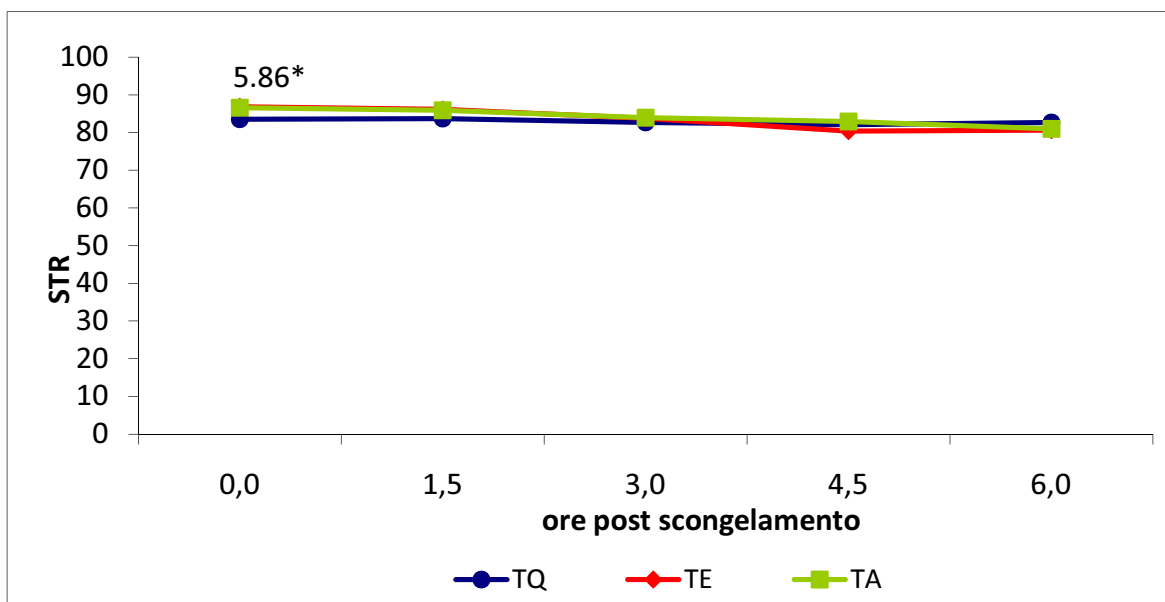


Grafico 4.7: curve di decadimento della STR nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

La STR possiede un andamento ancora diverso rispetto ai parametri considerati precedentemente. Il peggioramento nel tempo è stato minimo e l'unico momento in cui TE e TA hanno portato a un miglioramento significativo del parametro è stato allo scongelamento. Nelle ore successive il miglioramento non è stato statisticamente apprezzabile.

LIN

Ora	TQ	TE (<i>EquiproTM</i>)	TA (<i>EquiproTM</i> + α tocoferolo)
0	47.08	52.18	51.77
1,5	45.62	50.51	50.38
3	44.62	48.87	47.59
4,5	46.21	45.44	47.59
6	50.92	47.85	47.28

Tab. 4.11: % di LIN per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

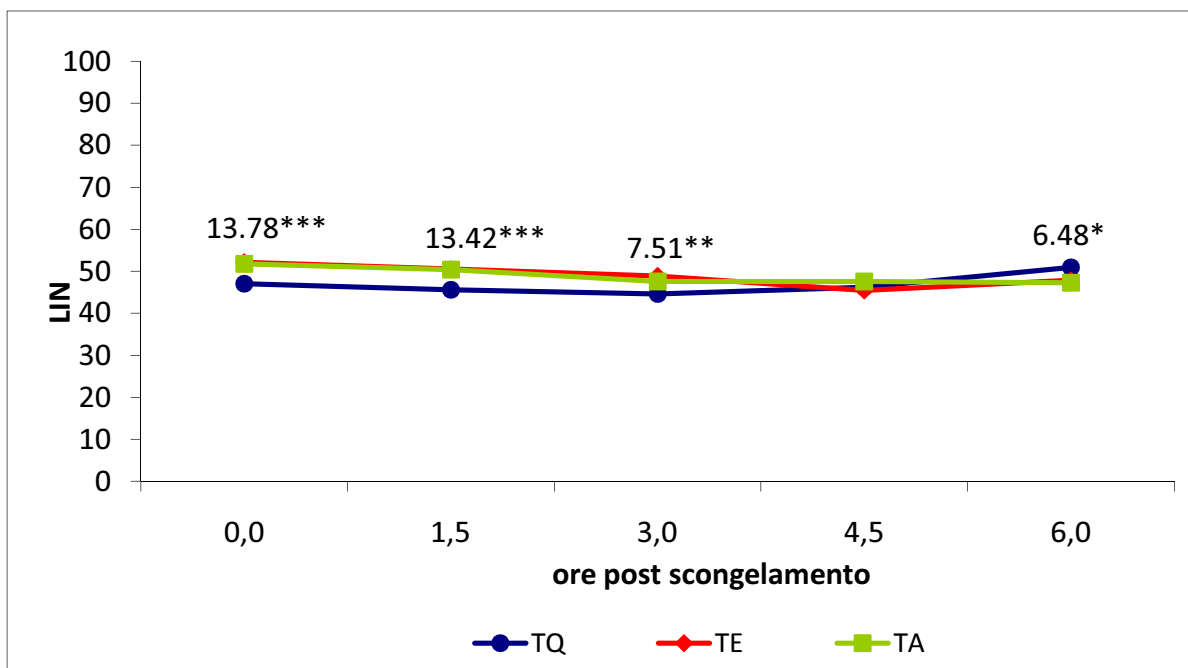


Grafico 4.8: curve di decadimento della LIN nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

La LIN ha mostrato un andamento particolare. TE+TA ha migliorato significativamente il parametro nelle prime tre osservazioni, dopo 4,5 ore le differenze si sono annullate mentre alla sesta ora la linearità era più elevata in TQ rispetto a TE+TA. Osservando la tabella 4.11 si può notare come il valore di TQ peggiori gradualmente fino a mostrare un miglioramento dall'ora 4,5 all'ora 6. Inspiegabilmente la LIN di TQ migliora complessivamente dell'8.06%. La LIN è un parametro indice di movimento lineare e più è elevato, più lineare è il movimento, per cui ci appare difficoltoso comprendere il motivo per cui al peggiorare di PMS (e quindi un aumento di VCL e/o una diminuzione di VSL), LIN invece migliori.

ALH

Ora	TQ	TE (<i>Equipro</i> TM)	TA (<i>Equipro</i> TM + α tocoferolo)
0	5.51	5.00	4.92
1,5	5.25	4.89	4.97
3	5.24	4.97	5.00
4,5	5.14	5.15	5.34
6	5.10	5.07	5.00

Tab. 4.12: % di ALH per ogni tesi e per ogni ora di osservazione

L'ALH ha un andamento prettamente lineare, non c'è un peggioramento vero e proprio nel tempo né una differenza tra le varie tesi, e infatti è in linea con i risultati dell'ANOVA, nella quale il parametro non ha dimostrato nessuna differenza significativa relazionata agli effetti. Allo scongelamento TQ era significativamente migliore rispetto a TE+TA ma successivamente i dati delle tre tesi si sono attestati su valori simili. Osservando la tabella si può notare come in TQ i valori diminuiscono, mentre in te e in TA essi aumentano, ma queste variazioni non sono statisticamente significative.

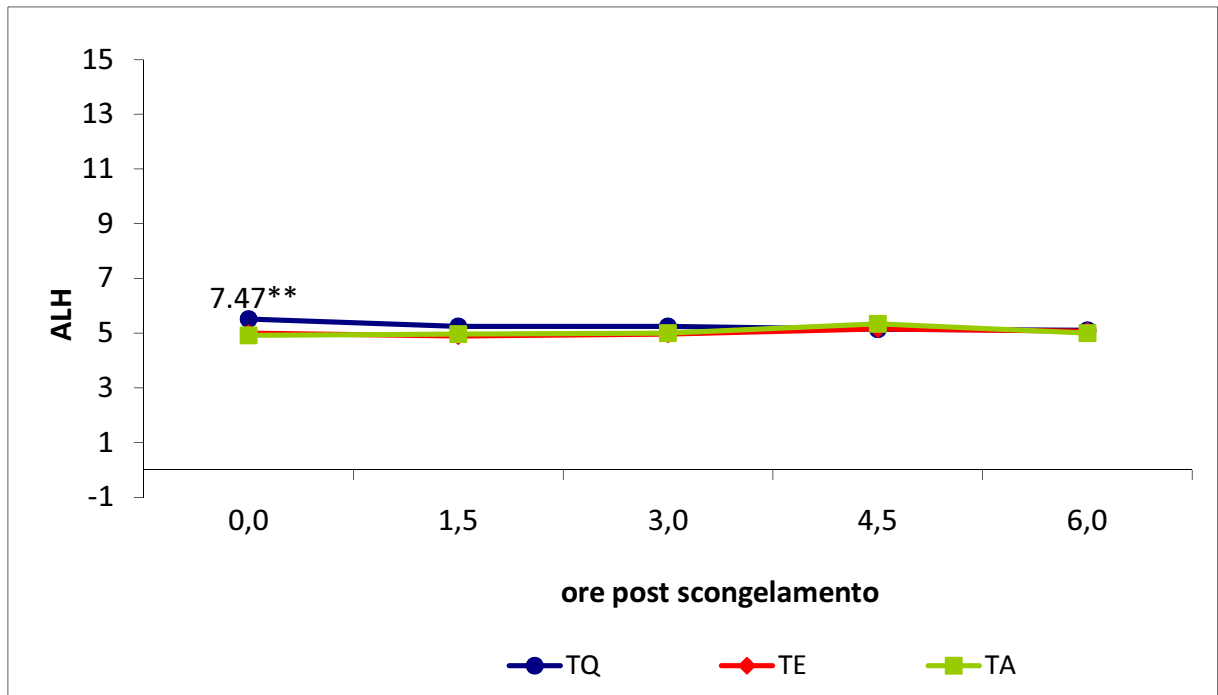


Grafico 4.9: curve di decadimento di ALH nel tempo, con i relativi contrasti in evidenza

Il parametro ALH si definisce come lo spostamento medio o massimo della testa lungo la sua traiettoria curvilinea media e descrive movimenti caratterizzati da ridotto moto ondulatorio [19]. E' un parametro che descrive il tipo di movimento dello spermatozoo a parità di velocità e di traiettoria percorsa. In un lavoro centrato sulla suddivisione della popolazione spermatica di seme fresco in sottopopolazioni in base al tipo di movimento, l'ALH era più elevato nelle sottopopolazioni con un movimento attivo, ma prevalentemente non lineare e circolare che potrebbe rappresentare cellule iperattivate [19]. Conoscendo questo risultato e sapendo che per avere maggiori probabilità di fecondare un'oocita, uno spermatozoo dovrebbe avere una motilità lineare progressiva, contrasta il risultato di uno studio umano, nel quale i valori di ALH sono risultati essere significativamente più elevati nel gruppo che dava poi origine a una gravidanza rispetto al gruppo in cui non la si otteneva [20]. Nel primo lavoro citato [19] lo studio è stato ripetuto 24 ore dopo, quindi su seme refrigerato, e i valori di ALH sono notevolmente diminuiti, dovuto forse alla riduzione di vitalità. I valori più elevati però erano sempre quelli nella sottopopolazione con il movimento di tipo circolare. Il lavoro sul seme umano è stato fatto su seme scongelato, quindi probabilmente il gruppo che non

dava origine a una gravidanza aveva bassi valori di ALH perché il seme era meno vitale. Aver analizzato materiale seminale di specie diverse e con diversa modalità di conservazione può aver condizionato l'ottenimento di risultati contrastanti. Non è l'unico studio umano che ha evidenziato come valori più elevati di ALH siano correlati a gravidanze e l'ipotesi avanzata è quella che all'aumentare dello spostamento laterale della testa aumenti la facilità con cui lo spermatozoo penetra attraverso la zona pellucida [37].

Nei grafici precedenti (grafici 4.2 – 4.9) non c'è differenza statisticamente significativa tra TE e TA tranne per VSL e VAP alla sesta ora. C'è invece costante significatività nella differenza tra i vari parametri relativi a TQ rispetto a quelli di TA+TE come riportato nei grafici. Tutti i parametri sono peggiorati nel tempo tranne TQ della LIN in cui c'è una significativa differenza positiva rispetto a TE+TA di 6.48% , ma è un valore dissociato dal *trend* di tutti gli altri parametri. L'aumento del valore di LIN nel TQ può essere dovuto al fatto che la VSL di TQ è diminuita meno rispetto a quella di TE+TA e la VCL invece è diminuita di più rispetto alla VCL di TE+TA. Per tutti i parametri, tranne la STR, TQ peggiorava di più rispetto a TE+TA. I parametri STR e LIN sono gli unici che derivano da un rapporto tra due altri parametri (VSL/VAP e VSL/VCL rispettivamente) e sono gli unici che si sono comportati in maniera diversa rispetto agli altri, dimostrando solo un lieve peggioramento dei valori di TQ rispetto a TE+TA (STR) o addirittura un miglioramento degli stessi (LIN).

4.5 Il movimento

Il movimento dello spermatozoo è reso possibile dalla molecola di ATP che aziona il meccanismo complesso dell'assonema che forma il flagello. Perché esso sia progressivo, il flagello deve piegarsi in maniera sincrona nei vari segmenti, come un'onda sinuosa che parte dalla regione del collo e che si propaga fino alla punta del flagello, e la testa non deve oscillare eccessivamente [10]. Il movimento elicoidale è causato dalla perdita del movimento sincrono, reso possibile dall'attivazione coordinata dei componenti dell'assonema, e non è efficace a produrre un movimento lineare utile [10].

Il miglioramento della MOT e dei PMS in seguito alla diluizione con *Equipro*TM può essere dovuto alla disponibilità di nuovi substrati per la produzione di ATP per sostenere il movimento, alla riduzione dell'osmolarità e della concentrazione del crioprotettore e alla presenza di nuovi antiossidanti che proteggono la membrana cellulare dall'ossidazione. Anche uno studio su seme congelato di gatto ha ottenuto risultati positivi dalla diluizione post scongelamento del seme: ne ha migliorato la motilità, l'integrità della membrana e dell'acrosoma [31]. Uno studio su seme congelato canino ha invece ottenuto risultati controversi: la diluizione post scongelamento del seme aveva effetti positivi solo quando il diluente per il congelamento conteneva un particolare prodotto commerciale [31]. Sembra quindi che l'effetto della diluizione dipenda dalla natura del diluente e del crioprotettore, in quanto possono interagire tra di loro in modi diversi. Un altro studio su seme canino ha riportato un miglioramento della motilità progressiva e della vitalità in seguito a diluizione del seme scongelato, in particolare con le diluizioni maggiori, e senza tener conto di diversi diluitori [43]. Il movimento dipende sia dall'integrità della membrana cellulare, messa a repentaglio dal danno perossidativo, dal freddo e dalle manipolazioni, sia dall'integrità della funzione mitocondriale deputata alla produzione di ATP necessario per attivare il movimento e il metabolismo della cellula [26]. Nei polli è stata trovata un'importante correlazione positiva tra la motilità, il consumo di ossigeno e il contenuto cellulare di ATP. Il contenuto di ATP negli spermatozoi suini è doppio rispetto a quello presente negli spermatozoi equini, quindi le differenze nel contenuto di ATP e del consumo di ossigeno potrebbero spiegare le differenze esistenti tra le diverse specie [22]. Ci sono risultati contrastanti riguardo le

correlazioni tra la motilità e gli altri parametri di movimento e tra questi e la fertilità. Lo studio di *Pesch et al.* del 2006 è riuscito a correlare positivamente la percentuale di motilità degli spermatozoi con la loro velocità e con la fertilità del soggetto esaminato [11]. Bisogna però tenere conto del fatto che la fertilità, e l'eventuale concepimento, dipendono non solo dal materiale seminale, ma anche dalla componente femminile che svolge un ruolo importante, e quindi difficilmente potrà esistere uno o più parametri correlati direttamente con il grado di fertilità e/o con la probabilità di ottenere una gravidanza [24]. Ad esempio, il movimento degli spermatozoi all'interno delle vie genitali femminili è in parte dovuto anche alle contrazioni muscolari dell'apparato genitale [11]. Correlazioni positive tra la motilità e gli altri parametri misurati dal sistema CASA sono state messe in evidenza solo sul seme fresco; sul seme conservato (refrigerato o congelato) vengono perse. In particolare, la correlazione positiva della motilità con la VCL e la VAP evidenzia come le cellule più motili abbiano anche una velocità maggiore rispetto alle cellule meno motili e la correlazione positiva con la VSL dimostra che oltre a essere più veloci, si muovono anche in modo più lineare [22]. Lo studio di *Love et al.* (2003) mette però in luce come la motilità totale non sia correlata con la velocità e la natura del movimento, in quanto non è associata in alcun modo ai valori di LIN, STR e ALH [23]. Un altro studio di riproduzione umana non ha trovato differenze nei parametri analizzati con il sistema CASA tra il gruppo di successo o di fallimento (gravidanza ottenuta o meno), ma significativa è stata la differenza di concentrazione degli spermatozoi motili e progressivamente motili, in modo particolare quelli valutati dopo lo scongelamento [24]. Nel presente lavoro invece, la correlazione tra MOT e PMS e VCL, VSL e VAP è superiore al 50% nonostante si tratti di seme scongelato, mentre per STR, LIN e ALH si attesta su valori inferiori al 50% (tabella 4.13).

Correlazioni						
	VAP	VSL	VCL	STR	LIN	ALH
MOT %	75.0%	77.3%	67.8%	14.9%	0.8%	22.3%
PMS %	69.9%	75.4%	60.6%	22.6%	9.2%	13.0%

Tab. 4.13 correlazioni tra MOT e PMS e i restanti parametri

Una riduzione della motilità può essere dovuta alla permanenza anche solo parziale del plasma seminale, anche se il suo effetto sulla motilità progressiva è ancora controverso [21]. Secondo *Scherzer et al.* un contenuto di plasma seminale inferiore al 12% del volume totale del seme diluito ha dimostrato di migliorare la qualità del seme congelato e addirittura, l'aggiunta di circa 30% di plasma seminale di seme di stalloni *good freezer* ha migliorato la motilità progressiva post scongelamento del seme di stalloni *bad freezer*, dimostrando che forse non tutti i componenti del plasma seminale sono dannosi per il mantenimento della motilità progressiva [3]. E' stata inoltre trovata una correlazione significativa tra la motilità, sia totale che progressiva, e l'enzima γ -glutamyl-transferasi (GGT) e l'enzima lattato deidrogenasi (LDH), dovuto alla loro ipotetica azione antiossidante [21]. Correlazioni positive sono state trovate anche nel seme diluito fresco, ma non in quello refrigerato, tra la motilità, l'integrità di membrana e gli enzimi ad azione antiossidante GSH (glutazione perossidasi) e CAT (catalasi) [16]. Invece la correlazione tra motilità e TBARS (sostanze reattive all'acido tiobarbiturico, un indicatore chimico di perossidazione lipidica) è risultata negativa, indicando quindi che l'elevata attività antiossidante è correlata con una ridotta perossidazione degli acidi grassi di membrana e contribuisce molto probabilmente all'iniziale elevata percentuale di cellule motili e con la membrana integra [16] e che la perossidazione lipidica altera meccanismi o strutture connesse al movimento [30]. Non è stata trovata alcuna correlazione tra l'iniziale attività enzimatica antiossidante nel seme, prodotti finali della perossidazione lipidica e parametri qualitativi del materiale seminale refrigerato in seguito a diluizione e questo ha portato a ipotizzare che una volta aggiunto il diluitore, il danno perossidativo non sia la causa principale del decadimento qualitativo, anche perché è stato rilevato un marcato aumento dell'attività antiossidante quando il diluitore è stato aggiunto [16]. La motilità dipende in parte anche dalle concentrazioni di rame: è un microelemento necessario per il funzionamento dell'enzima superossido dismutasi (SOD), deputato all'eliminazione dei radicali dell'ossigeno, e dell'enzima mitocondriale citocromo C ossidasi, elemento della catena della fosforilazione ossidativa nei mitocondri, ma concentrazioni troppo elevate riducono i processi ossidativi e la glicolisi portando all'immotilità [21].

Altri fattori che influenzano la motilità sono la concentrazione spermatica, la viscosità, la temperatura e la profondità del mezzo.

Lo studio di *Bozkurt et al.* (2007) ha messo in evidenza come il seme refrigerato e diluito alla concentrazione di 25×10^6 spermatozoi ha mostrato una motilità e una longevità maggiore rispetto a seme con concentrazioni più elevate perché le cellule hanno una maggior quantità di substrato energetico a disposizione [28]. C'è inoltre una correlazione negativa tra tutte le concentrazioni spermatiche e la motilità [28]. La concentrazione spermatica può influenzare notevolmente la misurazione dei parametri, sia morfologici sia di movimento, poiché molte cellule si possono sovrapporre completamente o parzialmente se la concentrazione è troppo elevata [25]. Una ridotta viscosità, dovuta ad esempio a una diluizione, favorisce la progressione lineare del movimento perché c'è una minore sovrapposizione di traiettorie di cellule diverse [19] e perché c'è una minore resistenza del mezzo. Questo può essere un altro motivo che spiega il miglioramento della motilità riscontrato nel presente lavoro. Ad esempio può aver influenzato i risultati ottenuti dall'osservazione del seme dello stallone *Campione*: la ridotta viscosità può aver favorito la motilità totale e progressiva, ma la diluizione può aver portato alla conta da parte del sistema CASA di un numero minore di cellule. D'altronde la diluizione per *Campione* era assolutamente necessaria perché il sistema CASA non era in grado di discriminare le singole cellule spermatiche. Temperature di 32-37°C aumentano la motilità rispetto alle temperature ambientali (circa 22°C). Se la profondità della goccia esaminata è ridotta, lo spermatozoo può non aver spazio a sufficienza per muoversi e quindi si potrà osservare un aumento dell'ALH e una diminuzione della STR e della LIN.

La motilità di cui è dotato lo spermatozoo è un prerequisito fondamentale per la fecondazione, ma per riuscirci non solo deve avere una velocità e un tipo di movimento adatto, ma deve essere anche 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 e legarsi alla membrana cellulare [10]. Non tutti gli spermatozoi motili saranno in grado di fecondare la cellula uovo, ma gli spermatozoi più motili hanno sicuramente una probabilità di successo maggiore.

4.6 Lo stato ossidativo

Nel lavoro di *Aurich et al.* (2006) l'aggiunta dell'antiossidante N-acetyl cisteina all'*extender EquiproTM* in seme refrigerato non privato del plasma seminale non ha modificato né positivamente né negativamente i valori della motilità e dell'integrità di membrana rispetto ad altri diluitori senza antiossidanti aggiunti [16]. Questo risultato negativo potrebbe essere dovuto alla mancata centrifugazione del seme (il plasma seminale è dannoso per la conservazione del seme) o all'inefficacia degli antiossidanti sulle membrane mitocondriali, poiché, che essi siano naturali o aggiunti, possono avere difficoltà nel raggiungere le membrane intracellulari [16]. Essendo l' α tocoferolo un antiossidante di natura lipidica, dovrebbe essere in grado di penetrare più facilmente attraverso le membrane e quindi di raggiungere i mitocondri, ma nel presente lavoro non ha portato a un ulteriore miglioramento significativo rispetto al seme diluito senza l' α tocoferolo. Però in uno studio di *Agüero et al.* del 1995 l'aggiunta di vitamina E prima di refrigerare il seme ha portato a un effetto protettivo sulla membrana cellulare e ha mantenuto elevata la motilità progressiva [9]. In un altro studio su seme suino congelato l'aggiunta di 200 $\mu\text{g/ml}$ di α tocoferolo acetato prima del congelamento ha migliorato alcune caratteristiche funzionali degli spermatozoi (motilità, vitalità, integrità dell'acrosoma e suscettibilità alla perossidazione lipidica) rispetto a seme non trattato o con concentrazioni maggiori di antiossidante [30]. Concentrazioni più elevate di α tocoferolo hanno migliorato solo la motilità nelle prime due ore post scongelamento; gli autori dello studio ipotizzano che l' α tocoferolo a concentrazioni superiori a 200 $\mu\text{g/ml}$ agisca come un'agente ossidante [30]. Uno studio su seme canino ha dimostrato che l'aggiunta di α tocoferolo dopo lo scongelamento ha migliorato leggermente i valori di motilità totale e lineare e la vitalità senza modificare in modo significativo i livelli di ROS [35]. È interessante notare come gli studi in cui l'aggiunta di un antiossidante ha portato a risultati positivi, sono principalmente quelli in cui l'antiossidante è stato aggiunto prima del congelamento. Probabilmente l'aggiunta dell' α tocoferolo prima del congelamento porta a un miglioramento sostanziale dei parametri qualitativi perché ha tempo di essere incorporato nel doppio strato fosfolipidico della membrana cellulare e la protegge al momento dello scongelamento impedendone il danneggiamento precoce.

Essendo la motilità iniziale favorita dall'attività antiossidante, tanto più elevata è tale attività iniziale nel seme, più pronunciata sarà la perdita della motilità e dell'integrità di membrana nel tempo [16]. Anche nel presente lavoro si può notare una differenza nell'entità del peggioramento dei valori di motilità totale e progressiva.

4.7 Effetti differenziali sul movimento tra stalloni good e bad freezer

E' stata confrontata l'entità del decadimento di MOT e PMS nel tempo tra il tal quale (TQ) e la media delle due tesi di trattamento TE e TA (TR), prendendo in considerazione due stalloni con seme di buona qualità (*Coriander* e *Sirius*) e due stalloni con seme di qualità medio-scarsa (*Goodwil* e *Corgraf*), chiamando i due gruppi rispettivamente *good freezer* e *bad freezer*. I *good freezer* hanno generalmente ridotto volume e alta motilità prima del congelamento rispetto ai *bad freezer* [3,12]. I risultati ottenuti sono frutto di uno studio statistico descrittivo e sono meglio evidenziati attraverso i grafici 4.10 e 4.11.

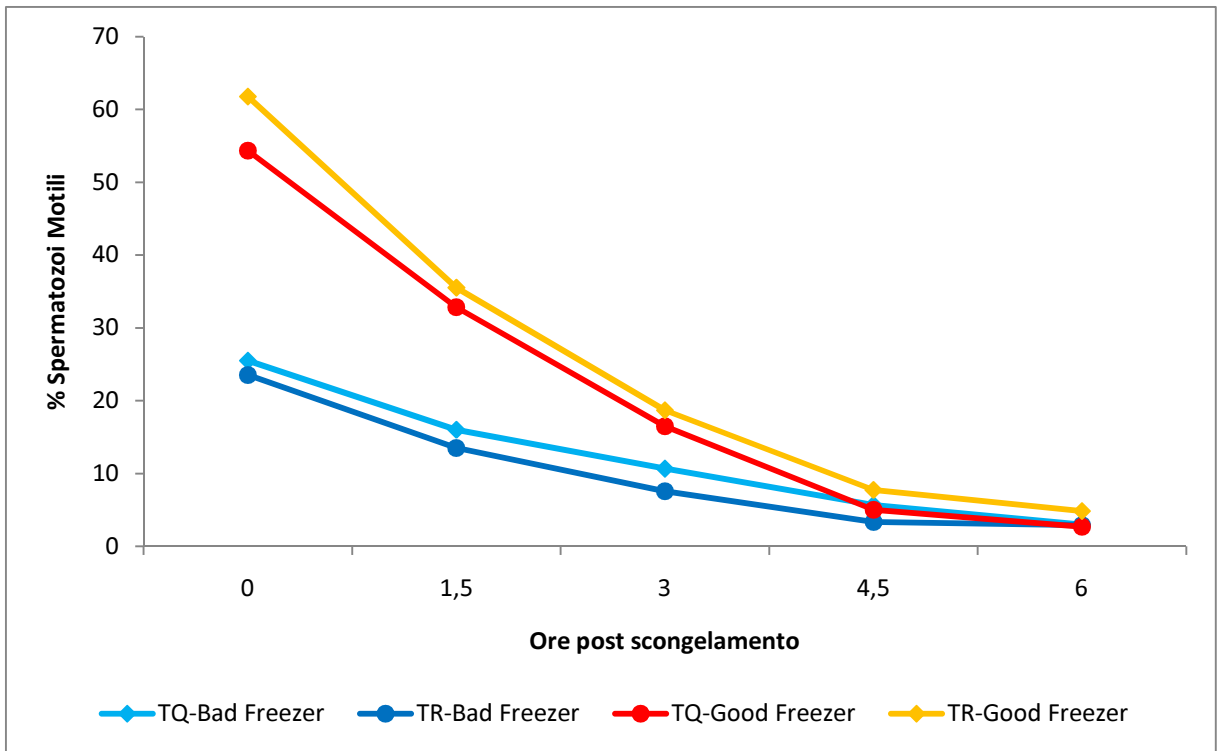


Grafico 4.10: curve di decadimento di MOT nei good e nei bad freezer

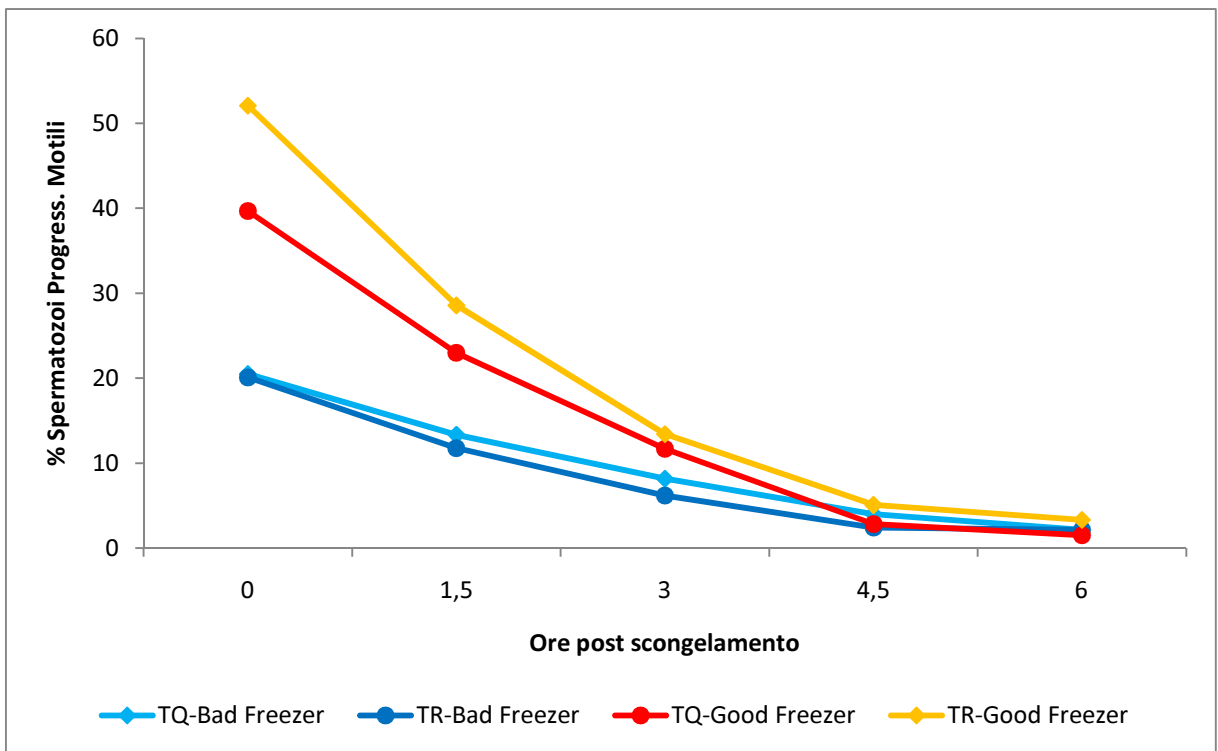


Grafico 4.11: curve di decadimento di PMS in good e in bad freezer

Dai grafici 4.10 e 4.11 si può vedere come il seme degli stalloni cosiddetti *good freezer* parta da valori più elevati rispetto al seme dei *bad freezer*, ma va incontro a un maggiore decadimento di MOT e PMS rispetto al seme dei *bad freezer*, per giungere alla sesta ora dove tutti i valori si eguagliano, indipendentemente dalla qualità del materiale seminale di partenza.

Il trattamento (diluizione con o senza α tocoferolo) porta a valori di MOT e PMS lievemente più alti rispetto al seme non trattato, ma solo nel gruppo dei *good freezer*, esitando nella creazione di due curve di decadimento quasi parallele, tranne nel caso di PMS. Nel seme trattato dei *good freezer*, il valore di PMS allo scongelamento è dell'11% più elevato rispetto al seme non trattato e solo all'ora 3 la curva dei valori del seme trattato diventa parallela a quella del seme non trattato.

Il seme dei *bad freezer* si comporta in modo opposto: le due curve di decadimento TQ e TR di MOT e di PMS sono sempre parallele tra di loro, ma è il TQ ad avere sempre valori lievemente più elevati rispetto a TR, tranne a T_0 nella curva dei PMS dove i valori delle due curve si eguagliano. I valori di MOT nel TQ nei *bad freezer* sono in media di 2.2 punti percentuali più elevati rispetto a TR e nel caso di PMS di 1.1 punti percentuali più elevati. E' un risultato statisticamente non supportato, ma di cui bisogna comunque tenerne conto perché potrebbe avere importanti ripercussioni a livello pratico. Se il materiale seminale di partenza è di scarsa qualità, non ci si può permettere di peggiorarlo e ridurne ulteriormente il suo potere fecondante diluendolo.

In linea generale la diluizione del seme migliora MOT e PMS solo degli stalloni considerati *good freezer*. Il parametro PMS ha risentito meglio della diluizione rispetto alla MOT, ma dall'ora 4,5 in poi i valori dei parametri sono simili in tutte e quattro le curve. Il peggioramento maggiore nei soggetti *good freezer* può essere dovuto al fatto che avere una motilità più elevata e un maggior numero di cellule motili, porti a un consumo precoce delle sostanze nutritive rispetto a seme con minor attività ma nelle stesse condizioni ambientali e implichi un metabolismo più attivo con conseguente maggiore produzione di cataboliti e di sostanze reattive dell'ossigeno.

La reazione alla diluizione opposta mostrata dal seme dei soggetti *bad freezer* rispetto a quello dei *good freezer* indica che la diluizione non solo non ha portato un effetto benefico, ma che ha anche arrecato ulteriori danni.

Durante il congelamento le cellule spermatiche vanno incontro a un progressivo aumento dell'osmolarità alla quale esse rispondono con una graduale disidratazione e riduzione di volume, per tornare al volume originario al raggiungimento dell'equilibrio tra l'acqua e il crioprotettore, e durante tutto il periodo di crioconservazione sono immerse in un ambiente iperosmotico [1,3,43]. Quando il materiale seminale dopo lo scongelamento viene deposto nel tratto genitale femminile, i liquidi ivi presenti entrano velocemente nella cellula, perché richiamati dall'elevata concentrazione intracellulare del crioprotettore rispetto all'ambiente esterno, che ha una minor permeabilità rispetto all'acqua, aumentandone velocemente il volume e facendola tornare a una condizione di isoosmolarità. Quando il crioprotettore diffonde sufficientemente dalla cellula, essa torna al suo volume originario [1,3,42]. Per essere in grado di modificare la propria omeostasi, la cellula deve avere membrane strutturalmente e funzionalmente integre [3]. L'aggiunta del diluente riduce l'osmolarità del mezzo, mimando quello che succede al momento della deposizione del seme nel tratto genitale femminile. La gravità dello *shock* osmotico subito dipende dal rapporto della diluizione e dalla velocità con la quale viene effettuata [43]. Il cambio improvviso di osmolarità può danneggiare irreversibilmente membrane già fragili ed ecco che si spiegherebbe come mai la diluizione, quindi l'evento traumatico, peggiori la motilità rispetto al seme non trattato. Infatti, il danno di membrana esita nella perdita irreversibile di motilità e quindi di potere fecondante [23,26], poiché perde la capacità di mantenere l'omeostasi e può perdere anche contenuto cellulare, tra cui ad esempio l'ATP. Per cui la perdita di motilità non è relazionata solo alla perossidazione lipidica a carico dei fosfolipidi di membrana, ma anche alla perdita dell'energia prodotta nei mitocondri sotto forma di ATP [26].

La membrana cellulare può venire danneggiata dalla formazione dei cristalli di ghiaccio, dalla perossidazione lipidica o da stress meccanici (ad esempio una centrifugazione troppo vigorosa), ma la maggiore fragilità degli spermatozoi di soggetti definiti *bad freezer* può essere dovuta a una diversa composizione della membrana plasmatica.

Le differenze nel contenuto di colesterolo nella membrana plasmatica sono state correlate alla diversa sensibilità allo *shock* da freddo degli stalloni [26]. Se si tiene conto del fatto che un maggiore contenuto di colesterolo nella membrana cellulare mantiene una maggiore fluidità della stessa a temperature più basse e aumenta i limiti di tolleranza osmotica [1], si può ipotizzare che i soggetti *bad freezer*, meno resistenti al congelamento, contengano un minor contenuto di colesterolo nelle membrane cellulari che quindi le rende più fragili. Non solo il contenuto di colesterolo, ma anche la composizione lipidica e il rapporto tra gli acidi grassi saturi e insaturi influisce sulla sensibilità delle membrane al congelamento [32]. Un ruolo particolarmente importante sembra assumerlo il DHA, che se integrato con la dieta aumenta la fluidità delle membrane spermatiche nel suino, rendendo le membrane più resistenti [32].

5 Conclusioni

Al termine dell'analisi delle osservazioni fatte, si può concludere constatando un generale e costante miglioramento qualitativo della maggior parte dei parametri misurati nelle aliquote di seme addizionate di *Equipro*TM con o senza l' α tocoferolo rispetto all'aliquota di seme puro. Nel presente studio l'aggiunta dell'antiossidante non ha portato a un ulteriore miglioramento statisticamente significativo rispetto alla diluizione solo con *Equipro*TM. In particolare, il trattamento ha migliorato la caratteristica più importante ai fini della fecondazione, cioè la motilità progressiva, e non solo subito dopo lo scongelamento, ma il miglioramento si è mantenuto statisticamente significativo fino a 4,5 ore dopo lo scongelamento, momento cruciale per la fecondazione dell'oocita nelle tube rendendo la diluizione raccomandabile specialmente quando si scelga di effettuare la fecondazione pre-ovulazione. Solo gli stalloni *good freezer* hanno risentito positivamente dell'effetto diluizione, mentre gli stalloni del gruppo *bad freezer* non solo non sono migliorati, ma hanno subito un lieve peggioramento statisticamente non supportato della motilità.

I vantaggi della diluizione post scongelamento del seme vengono evidenziati dal fatto che aumenta la probabilità che avvenga la fecondazione, in quanto aumenta la quota di spermatozoi progressivamente motili e la linearità del movimento viene mantenuta più a lungo.

La diluizione post scongelamento aumenta il volume della dose e può essere un vantaggio per i neofiti che hanno ancora poca esperienza e manualità, ma può essere uno svantaggio nel caso in cui si debbano inseminare cavalle soggette a endometrite post coitale, perché aumentando il volume del materiale seminale si può favorire o amplificare l'insorgenza di una reazione infiammatoria.

6 Riferimenti Bibliografici

- [1] Graham J.K., Glazar A.I., Mullen S.F. Liu J., Benson J.D., Critser J.K., Squires E.L., (2009) **Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol** "Cryobiology" 59: 201–206
- [2] Almeida J., Ball B.A. (2005) **Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa** "Animal Reproduction Science" 87: 321–337
- [3] Scherzer J., Fayrer-Hosken R.A., Aceves M., Hurley D.J., Ray L.E., Jones L., Heusner G.L. (2009) **Freezing equine semen: the effect of combinations of semen extenders and glycerol on post-thaw motility** "Australian Veterinary Journal" Volume 87, No 7
- [4] Bruemmer J.E., Wilson C.H., Coutino da Silva M., Squires E.L. (2009) **Effects of Hyaluronan Supplementation on Cryopreserved Equine Spermatozoa Hyaluronan and Cryopreserved Equine Spermatozoa** "Journal of Equine Veterinary Science" Vol 29, No 4
- [5] Devireddy R.V., Swanlund D.J., Olin T., Vincente W., Troedsson M.H.T., Bischof J.C., Roberts K. P. (2002) **Cryopreservation of Equine Sperm: Optimal Cooling Rates in the Presence and Absence of Cryoprotective Agents Determined Using Differential Scanning Calorimetry** "Biology of Reproduction" 66: 222–231
- [6] Baumber J., Ball B.A., Linfor J.J., Meyers S.A. (2003) **Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa** "Journal of Andrology" Vol. 24, No. 4
- [7] Baumber J., Vo A., Sauber K., Ball B.A. (2002) **Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa** "Theriogenology" 57: 1025-1033

- [8] Khalifa T.A.A., Waheed M.M. (2006) **An endeavor to improve longevity of cryopreserved equine sperm** "American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci." 1 (2): 91-95
- [9] Neild D.M., Brouwers J.F.H.M., Colenbrander B., Agüero A., Gadella B.M. (2005) **Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa** "Molecular reproduction and development" 72: 230-238
- [10] McKinnon A.O., Voss J.L. (1993) **Equine reproduction** "Williams & Wilkins", Philadelphia: 705-754
- [11] Nervo T., Semita C., Pescarolo C. (2010) **Analisi computerizzata di seme equino fresco e refrigerato appartenente a tre razze differenti** "Ippologia" Anno 21, n. 2: 27-34
- [12] Reed S.M., Bayly W.M., Sellon D.C. (2010) **Equine internal medicine** "Saunders Elsevier" St Louis MO, 3rd edition: 1098-1101
- [13] <http://www.hamiltonthorne.com/products/casa/>
- [14] Mantovani R., Rota A., Falomo M.E., Bailoni L., Vincenti L. (2002) **Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and with hypo osmotic swelling test** "Reprod. Nutr. Dev." 42: 217-226
- [15] Perez-Osorio J., Mello F.G.C., Juliani G.C., Lagares M.A., Lago L.A., Henry M. (2008) **Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures** "Anim. Reprod." v.5, n.3/4: 103-109
- [16] Pagl R., Aurich C., Kankofer M. (2006) **Anti-oxidative Status and Semen Quality during Cooled Storage in Stallions** "J. Vet. Med." A 53: 486-489

[17] Andrabi S.M.H., Ansari M.S., Ullah N., Afzal M. (2008) **Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa** "Pakistan Vet. J." 28(4): 159-162

[18] www.wbfsh.org

[19] Quintero-Moreno A., Mirò J., Teresa Rigau A., Rodriguez-Gil J.E. (2003) **Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates** "Theriogenology" 59: 1973-1990

[20] Frèour T., Jean M., Miralliè S., Dubourdiou S., Barrière P. (2010) **Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles** "European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology" 149: 186–189

[21] Pesch S., Bergmann M., Bostedt H. (2006) **Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality** "Theriogenology" 66: 307–313

[22] Vizcarra J.A., Ford J.J.(2006) **Validation of the sperm mobility assay in boars and stallions** "Theriogenology" 66: 1091–1097

[23] Love C.C., Thompson J.A., Brinskob S.P., Rigbyc S.L., Blanchard T.L., Lowryd V.K., Varner D.D. (2003) **Relationship between stallion sperm motility and viability as detected by two fluorescence staining techniques using flow cytometry** "Theriogenology" 60: 1127–1138

[24] Freour T., Jean M., Mirallie S., Langlois M.L., Paul Barriere S.D. (2008) **Predictive value of CASA parameters in IUI with frozen donor sperm** "International Journal of Andrology" 32: 498–504

- [25] Rijsselaere T., Van Soom A., Hoflack G., Maes D., de Kruif A. (2004) **Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser** "Theriogenology" 62: 1292-1306
- [26] Aurich C. (2005) **Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa** "Animal Reproduction Science" 89: 65–75
- [27] Schembri M.A., Major D.A., Suttie J.J., Maxwell W.M.C., Evans G. (2003) **Modification of standard freezing media to limit capacitation and maximise motility of frozen-thawed equine spermatozoa** "Aust. Vet. J." 81: 748-751
- [28] Bozkurt T., Türk G., Gür S. (2007) **The time-dependent motility and longevity of stallion spermatozoa diluted in different spermatozoal concentrations and extenders during cool-storage** "Revue Méd. Vét." 158: 02, 67-72
- [29] Bollwein H., Fuchs I., Koess C. (2008) **Interrelationship between plasma membrane integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation in cryopreserved bovine spermatozoa** "Reprod. Dom. Anim." 43: 189–195
- [30] Breininger E., Beorlegui N.B., O'Flaherty C.M., Beconi M.T. (2005) **Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen** "Theriogenology" 63: 2126–2135
- [31] Chatdarong K., Thuwanut P., Manee-in S., Lohachit C., Axner E. (2010) **Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa** "Reprod. Dom. Anim." 45: 221–227
- [32] Maldjian A., Pizzi F., Gliozzi T., Cerolini S., Penny P., Noble R. (2005) **Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen** "Theriogenology" 63: 411–421

- [33] Carluccio A., Tosi U., Robbe D., De Amicis I., Zedda M., Melotti C., Parente R., Pau S., Contri A. (2008) **Citrato e fruttosio nel plasma seminale di stallone e caratteristiche del materiale spermatico** "XIV SIVE CONGRESS", Venezia, Palazzo del Casinò
- [34] De Vasconcelos A.B., De Souza P.C., Varago F.C., De Albuquerque Lagares M., Santoro M.M. (2009) **Determination of optimal glucose concentration for microcalorimetric metabolic evaluation of equine spermatozoa** "Braz. Arch. Biol. Technol." v.52 n.5: 1131-1136
- [35] Michael A., Alexopoulos C., Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D., Saratsis P., Boscoc C. (2007) **Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa** "Theriogenology" 68 : 204–212
- [36] Silva P.F.N., Gadella B.M. (2006) **Detection of damage in mammalian sperm cells** "Theriogenology" 65: 958–978
- [37] Milani C., Fontbonne A., Sellem E., Stelletta C., Gérard O., Romagnoli S. (2010) **Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen** "Theriogenology" 74: 153–164
- [38] Kumar, Abbas, Fausto (2006) **Robbins & Cotran: Le basi patologiche delle malattie** "Elsevier Italia" Milano, 7°edizione: 14-19
- [39] Golas A., Malek A., Piasecka M., Styrna J. (2010) **Sperm mitochondria diaphorase activity – a gene mapping study of recombinant inbred strains of mice** "Int. J. Dev. Biol." 54: 667-673
- [40] Bailey J.L., Bilodeau J.F., Cormier N. (2000) **Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon** "Journal of Andrology" Vol. 21, No. 1

- [41] De Lamirande E., Gagnon C. (1992) **Reactive oxygen species and human spermatozoa: effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes** "Journal of Andrology" Vol.13, No.5
- [42] Ball B.A., Vo A. (2001) **Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential** "Journal of Andrology", Vol. 22, No. 6
- [43] Peña A., Linde-Forsberg C. (2000) **Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa** "Therogenology" 54: 703-718
- [44] http://www.vetman.fi/user_files/files/Leaflet_EquiPro_en.pdf