



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE  
NATURALI E AMBIENTE  
DIPARTIMENTO DEL RELATORE MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI  
E SALUTE

Corso di laurea in  
SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

Effetto della stagionalità sulla morfologia spermatica di  
tori della razza Bruna

Relatore

Prof. Stelletta Calogero

Correlatore

Dott. Vencato Juri

Laureanda

Milena Montini

Matricola n. 2043382

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

*“The ones who are crazy enough  
to think that they can change the world,  
are the ones who do”*

Steve Jobs

## *Indice*

|  |    |
|--|----|
| Riassunto.....                                 | 4  |
| Abstract.....                                  | 5  |
| 1. Introduzione.....                           | 6  |
| 1.1 Origine della razza Bruna Italiana.....    | 7  |
| 1.1.1 Morfologia.....                          | 10 |
| 1.1.2 Caratteristiche produttive.....          | 11 |
| 1.1.3 Miglioramento genetico.....              | 12 |
| 1.1.4 Indice genetico.....                     | 12 |
| 1.2 Funzionamento del centro genetico.....     | 14 |
| 1.2.1 Genomica.....                            | 14 |
| 1.2.2 Ingresso dei giovani riproduttori.....   | 15 |
| 1.2.3 Addestramento dei torelli.....           | 16 |
| 1.2.4 Performance test.....                    | 17 |
| 1.2.5 Attività di salto.....                   | 19 |
| 1.2.6 Metodi di collezione del seme.....       | 22 |
| 1.2.7 Metodi di congelamento del seme.....     | 23 |
| 1.3. Requisiti fisici del riproduttore.....    | 24 |
| 1.3.1 Anatomia dell'apparato riproduttore..... | 24 |
| 1.3.2 Epididimo.....                           | 26 |
| 1.3.3 Libido.....                              | 27 |
| 1.3.4 Comportamento sessuale.....              | 28 |
| 1.4 Qualità seminale.....                      | 29 |
| 1.4.1 Spermatogenesi.....                      | 30 |
| 1.4.2 Controllo endocrino.....                 | 33 |
| 1.4.3 Spermatozoo.....                         | 34 |
| 1.4.4 Trasporto del seme ed eiaculazione.....  | 36 |

|  |    |
|--|----|
| 1.4.6 Volume.....  | 37 |
| 1.4.7 Concentrazione.....                                    | 38 |
| 1.4.8 Motilità.....  | 39 |
| 1.5 Morfologia spermatica.....                               | 41 |
| 1.5.1 Strumentazione utilizzata per le analisi del seme..... | 42 |
| 1.5.2 Preparazione del vetrino.....                          | 43 |
| 1.5.3 Difetti primari.....                                   | 46 |
| 1.5.4 Difetti secondari.....                                 | 48 |
| 2. Obiettivi dello studio.....                               | 52 |
| 3. Materiali.....  | 52 |
| 3.1 Soggetti in analisi.....                                 | 52 |
| 3.2 Creazione del database.....                              | 52 |
| 4. Metodi.....   | 53 |
| 5. Analisi.....  | 54 |
| 6. Risultati e discussione.....                              | 55 |
| 7. Conclusione.....  | 64 |
| 8. Bibliografia.....   | 66 |
| 9. Sitografia.....   | 70 |
| 10. Ringraziamenti.....                                      | 71 |

## Riassunto

Lo scopo dello studio è valutare l'influenza della stagionalità sui difetti morfologici del seme di tori della razza Bruna. È stato possibile grazie alle analisi dei dati raccolti nel centro genetico di Bussolengo "ANARB", e al confronto degli stessi negli anni, nei mesi e nelle stagioni. Sono stati analizzati un totale di 2449 campioni di seme, provenienti da diversi soggetti. L'obiettivo della selezione dei bovini di razza Bruna comprende la produzione di soggetti di buona mole, con struttura e costituzione solida, corretta conformazione, precoci per lo sviluppo e per la produttività, fecondi e longevi, di buona nevrilità, con attitudine ad elevate e costanti produzioni di latte ad alto titolo di grasso e di proteine, dotati di alto potere di assimilazione dei foraggi. Raggiunta l'età di 11 mesi i torelli iniziano la fase di addestramento e quindi di Performance test. Terminata questa fase, i tori iniziano la produzione vera e propria con la seguente distribuzione del seme negli allevamenti e la valutazione dei tori miglioratori. La valutazione completa del toro comprenderà lo stato fisico, dei genitali interni ed esterni, la qualità seminale e le capacità riproduttive. La valutazione del materiale seminale raccolto è un passaggio fondamentale dopo la raccolta del seme stesso, del processo che si concluderà poi con l'inseminazione artificiale. La definizione di difetti primari e secondari degli spermatozoi è importante per indicare l'origine e non la gravità di un difetto, in quanto i difetti sono indicatori di un disturbo della funzione riproduttiva. Un'informazione importante data da questo studio è che per la genetica di questa razza, su 22 anni di studi morfologici, i difetti della testa dello spermatozoo presentano la percentuale più alta (51,8%). Sta a significare che vi è un'anomalia nella maturazione spermatica. Negli anni si vede un leggero miglioramento, in quanto le medie dei difetti della testa calano da 52,9% a 47,7%. È un difetto compensabile per il motivo che il numero degli spermatozoi intatti rimarrà sempre più alto del numero di spermatozoi con difetti alla testa. Lo studio ha portato alla conclusione che i difetti spermatici sono maggiormente legati alla stagionalità, rispetto all'età o all'ambiente in cui vivono i tori.

## Abstract

The purpose of the study is to evaluate the influence of seasonality on the morphological defects of the Bruna breed bulls. It was possible thanks to the analysis of the data collected in the Bussolengo genetic centre "ANARB", and the comparison of the same in the years, months and seasons. A total of 2449 semen samples were analysed, from different subjects. The objective of the selection of cattle of the Bruna breed includes the production of subjects of good size, with solid structure and constitution, correct conformation, early for development and productivity, fertile and long-lived, of good nevrility, with aptitude for high and constant production of milk with high fat and protein, endowed with high power of assimilation of fodder.

At the age of 11 months, the bulls begin the training phase and then the Performance test. After this phase, the bulls begin the actual production with the following distribution of the seed in the farms and the evaluation of the improving bulls. The complete assessment of the bull will include physical status, internal and external genitals, seminal quality and reproductive capacity. The evaluation of the collected semen material is a fundamental step after the collection of the seed itself, of the process that will then end with artificial insemination. The definition of primary and secondary sperm defects is important to indicate the origin and not the severity of a defect, as defects are indicators of a reproductive function disorder. An important piece of information given by this study for the genetics of this breed is that, out of 22 years of morphological studies, the defects of the sperm head have the highest percentage (51,8%). It means that there is an anomaly in sperm maturation. Over the years there is a slight improvement, as the averages of head defects drop from 52,9% to 47,7%. It's a compensatory defect for the reason that the number of intact sperm will always remain higher than the number of sperm with head defects. The study led to the conclusion that sperm defects are more related to seasonality, compared to the age or the environment in which the bulls live.

## 1. Introduzione

Nei paesi maggiormente sviluppati, il settore della zootecnia ha adottato metodiche sempre più sviluppate volte a migliorare l'efficienza delle aziende e portare benefici agli animali: benessere, elevata produzione, riduzione delle patologie e fertilità.

Con l'ingente specializzazione del settore si è arrivati alla creazione di razze che rispondono alle esigenze del mondo economico: le necessità produttive, in termini quantitativi e la riduzione dei costi.

Tali obiettivi sono stati resi possibili grazie al miglioramento genetico e soprattutto agli strumenti per effettuarlo: inseminazione artificiale, selezione, scelta del riproduttore, valutazione della progenie ecc.

Al fine di identificare e selezionare i tori con un' elevata efficienza riproduttiva, l'analisi del seme ha ricevuto una notevole attenzione in relazione alla capacità degli spermatozoi per raggiungere un buon livello di fertilità.

I parametri da tenere in considerazione sono molti, così come le tecniche per valutarli: all'osservazione macro e microscopica si sono affiancate metodiche automatizzate, che consentono stime più precise per la concentrazione, motilità e vitalità degli spermatozoi.

Ma in particolare la morfologia e la morfometria degli spermatozoi ha dimostrato come sia fondamentale il giudizio soggettivo del tecnico di laboratorio; portando gli studi in continua espansione e rinnovamento, con l'applicazione di strumenti sempre più rinnovati.

Lo scopo di questo studio è dimostrare come la stagionalità influisca sulla morfologia dello spermatozoo, in quanto mira ad individuare i difetti primari, i quali si sono verificati durante la spermatogenesi e secondari, i quali si sono verificati durante il transito attraverso l'epididimo.

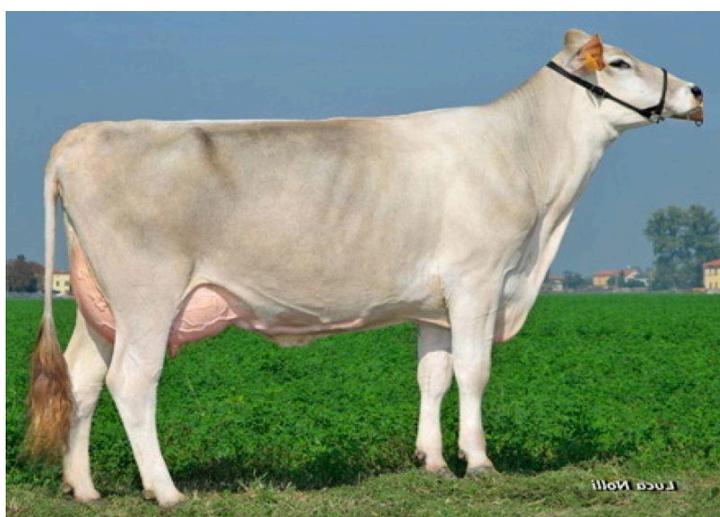
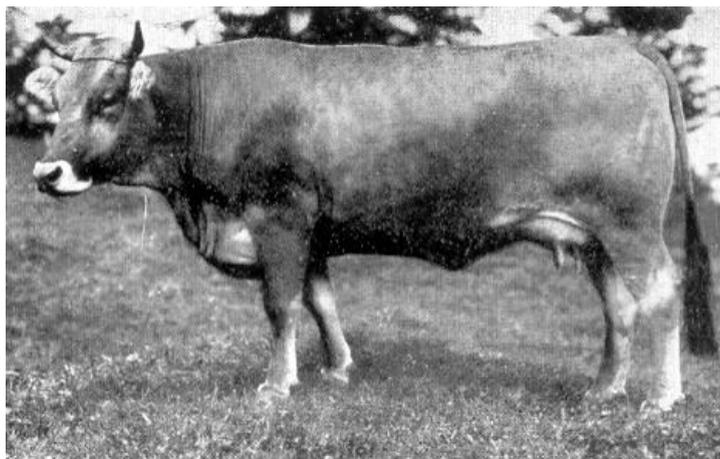
Come risoluzione delle problematiche legate ai difetti morfologici è quello di riconoscere il difetto, catalogarlo e diagnosticarlo al fine di limitare l'impatto o eliminarne l'incidenza.

## 1.1 Origine della razza Bruna Italiana

La Bruna deriva con tutta probabilità da un bovino ancestrale originario del Caucaso e dell'Asia minore, che popolava la regione alpina e parte dell'Europa centrale e che era caratterizzato da fronte piana ed allungata e corna brevi. Alcuni studiosi ritengono tuttavia probabile, nella formazione della razza Bruna anche l'influsso del *boss primigenius* (l'Uro selvaggio dalle grandi corna diffuso in quasi tutta l'Europa). Culla d'origine della Bruna è il cantone di Schwyz, dove nell'Abbazia di Einsiedeln, già intorno al 1000 d.C., i monaci benedettini le allevavano con grande passione. Dal 1500 venne attuato un sistematico piano di miglioramento per selezione, che mise in evidenza le grandi attitudini della razza predisponendone una grande espansione fuori dal territorio d'origine (a quel tempo la razza era molto variabile nel colore del mantello osservandosi il rosso, il bruno, il nero, il grigio sorcino ed il "fasciato"). L'opera di uniformazione dei vari bovini Brunni si poté dire conclusa nel 1880 quando era praticamente scomparsa ogni distinzione in gruppi morfologici salvo per il tipo "grigionese" soppresso nel 1911. La razza Bruna attualmente allevata sul territorio nazionale rappresenta il "ceppo" italiano della razza Bruna Alpina o di Schwyz, autoctona della Svizzera centrale, derivato dall'introduzione di soggetti elvetici, austriaci ed in particolare bavaresi, adattatisi ai nostri ambienti.

L'introduzione della Bruna Alpina in Italia ha inizio nel XVI secolo e attorno al 1850 (Fig. 1-1). L'espansione della razza è ben definita interessando le vallate alpine del versante sud e mammano dilagando nella Pianura Padana della Lombardia e del Veneto. La razza trovò però i massimi estimatori nelle grandi bergamine lombarde da tempo orientate verso l'allevamento di bovine da latte, sostituendo con impressionante rapidità le popolazioni bovine locali dal manto rosso o grigio. Nell'Italia centro-meridionale, la Bruna grazie alla sua nomea di grande produttrice, si diffuse nell'Appennino ligure e tosco-emiliano, nell'Abruzzo, nel Molise, nella Campania, nelle Puglie, nella Basilicata e nella Calabria, affiancando e sostituendo le razze locali (soprattutto di ceppo podolico) e trovando notevoli possibilità di espansione. In Sardegna, la Bruna, introdotta nei secoli passati attraverso l'uso di tori incrocianti sulla razza locale Sarda, ha creato un ragguardevole patrimonio

bovino con un ceppo tanto rustico e produttivo da assumere la denominazione Sardo-Bruna. Nel 1950, la razza Bruna rappresentava la razza bovina da latte più importante d'Italia. Tuttavia la sua vocazione prima alla triplice e poi alla duplice attitudine la fecero preferire sempre più alla razza Frisona Olandese, al tempo nettamente più lattifera. Alla Bruna Alpina si imputavano principalmente tre carenze: una scarsa precocità, una ridotta produzione al primo parto e la mancanza di riproduttori maschi in grado di trasmettere con costanza l'attitudine lattifera. In seguito, col passare degli anni, il costante miglioramento selettivo ha conferito alla razza una capacità di adattamento a tutti gli ambienti e produzioni qualitativamente elevate in risposta ad adeguate tecniche di allevamento. La specializzazione della razza ebbe inizio quando fu avviato il cosiddetto "esperimento Brown Swiss", cioè l'incrocio della Bruna Alpina "originale", più rustica ed adattabile all'alpeggio ma meno lattifera, con la razza Brown Swiss degli Stati Uniti, diventando una razza specializzata nella produzione di latte, con mole più elevata e morfologia angolosa. Grazie alla maggior diffusione della fecondazione artificiale, le caratteristiche della bovina permisero alla razza Bruna di riaffermarsi in tutte le zone di allevamento. Dal 1981 la razza è denominata "Bruna", abbandonando la denominazione "Alpina", a significare la sua versatilità nei confronti di tutti gli ambienti zootecnici italiani e la modifica sostanziale rispetto all'antico ceppo svizzero.



*Fig. 1-1 Le due foto mostrano come questa razza sia evoluta nel tempo, modificando le attitudini produttive e gli aspetti morfologici. A sinistra una vacca di razza Bruna Alpina (anni '50), a destra una vacca di razza Bruna Italiana (anno 2010).*

### 1.1.1 Morfologia

Le “caratteristiche morfologiche desiderabili” sono parte integrante delle norme tecniche del disciplinare del Libro Genealogico dei bovini di razza Bruna. Per il maschio sono analoghe illustrate per le femmine, ad esclusione degli aspetti specifici di quest’ultime e con ovvio riguardo alla mascolinità che si riflette in una maggior mole e una maggior potenza di ogni singola parte. È necessaria l’assenza di gravi difetti riconosciuti trasmissibili alla discendenza.

Il colore del mantello è bruno uniforme o variabile dal sorcino al castano (chiaro nelle femmine, più scuro nei maschi), a volte vi sono macchie bianche nel ventre o piccole nel corpo, la cute nera, la tipica orlatura bianca attorno al musello di colore nero ardesia contornato da un alone bianco. Il vitello alla nascita possiede un mantello grigio fino all’età di 3 mesi.

Gli arti sono lunghi, sottili ma robusti, i piedi forti (non a caso si adatta bene al pascolo) con unghia generalmente scura.

Il garrese è ben serrato, pronunciato e piuttosto allungato. La linea dorsale è rettilinea e/o leggermente rilevata, senza vuoto retroscapolare, con lombi larghi e forti senza depressione per essere di sostegno ad un capace addome. La groppa è lunga e larga, all’incirca livellata con ischio leggermente più basso dell’ileo, con spina sacrale rilevata, ma non alta. La coda è piuttosto sottile, con attacco non piatto o rientrato o alto. Il petto è forte e ampio per contribuire ad aumentare la cavità toracica.

La testa è lunga e sottile. In entrambi i sessi, il sincipite è arrotondato con peli lisci; la fronte è concava fra le arcate orbitarie; il profilo è dritto; le narici sono larghe; le guance sono robuste, asciutte; la bocca è ampia; la mandibola è larga, con arcata gengivale ben combaciante con l’arcata dentaria. Il collo è piuttosto allungato e sottile, ricco di pliche cutanee.

Le corna sono fini e bianche alla base e nere in punta; sono corte, solide, non grossolane nel maschio e lunghe, sottili, rivolte all’infuori nella femmina.

Le femmine presentano la cute della mammella rosea, non pigmentata (in passato esistevano precisi canoni riferiti al mantello oggi superati per dare spazio ad una più attenta analisi dei caratteri produttivi).

In generale, la mammella è voluminosa e ben attaccata, sporgente dalle natiche e con vene mammarie ed addominali ben evidenti.

Il peso medio in età adulta varia tra 500 e 700 kg. L'altezza al garrese è di 140 cm.

I maschi presentano altezza al garrese di 150 cm. Il peso medio in età adulta è di circa 1.000 kg. I maschi devono essere riproduttori in grado di migliorare le generazioni future.

### 1.1.2 Caratteristiche produttive

Con un patrimonio di 400.000 capi, le vacche allevate in Italia sono circa 300.000, 120.000 i capi iscritti al Libro genealogico, 90.000 le vacche sottoposte ai controlli funzionali e di queste oltre il 90% vengono inseminate artificialmente.

La Bruna Italiana è una razza capace di dare ragguardevoli produzioni di latte di notevole qualità, con rese alla caseificazione nettamente superiori alla media, particolarmente adatto alla produzione di formaggi tipici; buone rese in carne di qualità e grande capacità di adattamento ai più svariati ambienti agricoli.

La produzione media italiana per lattazione è di 7.425 kg, con il 3,59% di proteina e il 4,05% di grasso. Sulla base delle statistiche pubblicate dall'Associazione nazionale di razza (Anarb), i 20 migliori allevatori della Bruna Italiana non solo hanno produzioni medie di oltre 11.000 kg, ma la percentuale media di proteina si eleva a quota 3,79%. Per questo la Bruna Italiana viene inserita in molti allevamenti ad alta produzione lattifera per poter ritoccare, in senso positivo, la percentuale di proteina nel latte di massa conferito, al fine di raggiungere quei minimi percentuali che le normative UE e italiane ora giustamente prescrivono anche per i latti alimentari.

### 1.1.3 Miglioramento genetico

I centri genetici costituiscono la struttura concreta della selezione genetica delle razze in Italia. Qui si trovano i soggetti nati dai migliori riproduttori, ottenuti spesso da programmi di accoppiamento. I giovani tori presentano un elevato valore genetico, che si esprimerà durante l'attuazione dei programmi selettivi.

L'obiettivo della selezione dei bovini di razza Bruna comprende la produzione di soggetti di buona mole, con struttura e costituzione solida, corretta conformazione, precoci per lo sviluppo e per la produttività, fecondi e longevi, di buona nevrilità, con attitudine ad elevate e costanti produzioni di latte ad alto titolo di grasso e di proteine, dotati di alto potere di assimilazione per lo sfruttamento di tutti i foraggi aziendali. Grazie al miglioramento genetico perseguito in Italia da Anarb è cresciuto l'interesse degli altri Paesi dell'Unione europea, dell'Est europeo e dei Paesi del Bacino mediterraneo. Anche gli Stati Uniti d'America, dai quali è partita la matrice di miglioramento di tutta la Bruna europea, ovvero la Brown Swiss, richiedono capi italiani per i loro allevamenti.

Ad Aprile 2020 il Programma genetico di Anarb. è stato approvato dal Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali in applicazione del DLgs 52/2018 con il decreto (12520 del 08/04/2020), poiché risponde alle finalità di conservazione e di miglioramento genetico delle razze ed è in linea con la normativa in vigore.

### 1.1.4 Indice genetico

L'indice genetico è lo strumento di selezione che permette all'allevatore di scegliere accuratamente la rimonta della stalla (femmine giovani da allevare) e i tori da utilizzare per le inseminazioni.

Per ogni soggetto, sia maschio che femmina, iscritto al Libro genealogico, viene formulato ogni 3 mesi da un rapporto il quale comprende anche le stime del valore riproduttivo.

L'indice genetico utilizzato per la razza Bruna è chiamato Indice Totale Economico (ITE) e stima il valore globale dell'animale (maschio o femmina). L'indice di selezione si basa sull'analisi degli obiettivi di razza, dei legami genetici esistenti tra i caratteri

(correlazioni genetiche) e dell'importanza economica di ogni carattere. I valori attualmente in uso nella formula dell'ITE sono: Proteina (kg e %), Longevità funzionale, Velocità di mungitura, forza delle pastoie, cellule somatiche e punteggio finale. Il carattere di maggior importanza è "kg di proteina", seguito dalla "longevità funzionale", in coda la forza delle pastoie. L'indice "kg di proteina" è rivalutato del 5% se l'animale ha un genotipo per la k-caseina di tipo BB, che è il genotipo più favorevole nella caseificazione. Per gli animali con genotipo AB si ha una rivalutazione del 2,5% dell'indice "kg di proteina", mentre per gli animali con il genotipo meno favorevole (AA) non viene eseguita nessuna modifica.

Nel mese di aprile 2020 è stato applicato un piccolo adeguamento tecnico alla formula dell'ITE per applicare più accuratamente gli indirizzi selettivi decisi dalla CTC. In termini assoluti, le variazioni di ITE sono minime per le vacche e passano inosservate nei tori.

## 1.2 Funzionamento del centro genetico

### 1.2.1 Genomica

Oggi giorno l'approccio genomico permette di ottenere maggiori informazioni rispetto al progeny test e una valutazione più veloce dei tori.

La genomica individua un possibile riproduttore quando esso si trova in fase embrionale. L'unico tempo che si dovrà attendere è quindi quello per il raggiungimento della pubertà del torello, non la performance delle figlie come per il progeny test.

Una volta che il toro ha raggiunto la pubertà e sono state prodotte un numero considerevole di dosi, potrà anche essere eliminato, riducendo i costi di mantenimento in stalla.

Il disciplinare del Libro genealogico e regolamento del centro genetico prevedono che tutti i tori per poter accedere al Performance test siano in possesso di: requisiti genealogici e requisiti sanitari.

I requisiti genealogici sono:

- età minima di 8 mesi;
- due generazioni ascendenti dal Libro genealogico;
- in possessi del certificato d'ascendenza e genealogico;
- essere figli: di padre iscritto al Registro genealogico tori ed essere autorizzato all'I.A.; di madre in possesso di requisiti di madre di toro per l'I.A.

I requisiti sanitari comprendono il certificato dei gruppi sanguigni per l'accertamento della paternità e maternità. A questo scopo vengono effettuate due analisi, una prima dell'entrata e una durante la permanenza al centro.

Prima di entrare in allevamento i torelli sono soggetti a controlli: salute generale, corretto sviluppo dei testicoli e assenza di eventuali patologie, assenza di anomalie congenite, assenza di infezioni cutanee e corretta decornazione.

Inoltre è fondamentale eseguire un controllo delle tare genetiche (*weaver*, *SMA aracnomelia*), in quanto l'animale deve essere esente da patologie genetiche

ereditarie. La razza Bruna deve quindi evitare le tare per cui i portatori non sono più utilizzati, le vacche portatrici sono escluse dagli accoppiamenti, e i giovani individui portatori non sono ammessi alle prove di progenie.

#### 1.2.2 Ingresso dei giovani riproduttori

Si tratta della prima selezione che avviene nel centro genetico, in cui gli animali entrano nella zona di quarantena a 4-6 mesi di età dagli allevamenti privati situati in varie zone d'Italia: Veneto, Lombardia, Trentino Alto Adige, Emilia Romagna, Puglia e Basilicata.

Prima di essere scaricati vengono verificate le conformità di tutti i documenti che devono accompagnare gli animali (passaporto, certificati sanitari, documenti di trasporto...). Mancanze o non conformità dei documenti possono escludere il soggetto.

Successivamente si controlla lo stato di salute e di benessere degli animali per accertare che non abbiano subito dei traumi lungo il viaggio.

Prima di essere sistemati definitivamente nei loro box gli animali vengono pesati, poi eseguite le analisi del sangue dal veterinario del centro. Al termine di queste operazioni gli animali vengono fatti entrare nei loro box.

L'alimentazione nel box singolo per la prima settimana è composta da acqua e fieno, dalla seconda settimana in poi acqua, fieno e 1,2 Kg di mangime pellettato ogni 100 Kg di Peso Vivo.

Dopo 40 giorni finisce il periodo di quarantena e il torello viene spostato nel box multiplo all'età di 7 mesi fino agli 11 mesi. L'alimentazione è composta da 1,2 Kg di mangime ogni 100 Kg di Peso Vivo in 8 frazioni somministrate a intervalli di 3 ore da auto-alimentatori.

Dagli 11 mesi i torelli iniziano a saltare e vengono divisi in box singoli. L'alimentazione rimane invariata.

Trascorso il periodo di isolamento i torelli vengono trasferiti nella stalla del Performance test. Qui vengono applicati i collari con i trasponder per l'alimentazione automatica. Durante la loro permanenza in stalla si eseguono le attività quotidiane

accennate prima, e oltre a queste una volta al mese i torelli vengono pesati, e nei periodi prestabiliti (7-10-13 mesi) vengono fatte le misurazioni biometriche.

### 1.2.3 Addestramento dei torelli

Raggiunta l'età di 11 mesi i torelli iniziano la fase di addestramento e quindi di Performance test. La prima sessione di salto è di solo addestramento, successivamente per 6 settimane, una volta a settimana i torelli vengono fatti saltare e su questi test di salto si eseguono tutte le analisi del caso verificando le attitudini, le prestazioni e il seme del toro. Il toro viene portato in zona salto dove viene pulito, si tagliano i peli del prepuzio e della coda. Viene fatto saltare su un altro toro e se salta si prova a prelevare il seme con la vagina artificiale, la quale viene lavata e sterilizzata in stufa secca a 100°C; preparata alla temperatura di 42-44°C.

In questo caso il seme viene buttato.

Terminata questa fase, i tori iniziano la produzione vera e propria con la seguente distribuzione del seme negli allevamenti e la valutazione dei tori miglioratori.

Se il processo ha successo la settimana successiva inizia il Breeding Soundness Evaluation (BSE), altrimenti l'addestramento viene riproposto la settimana successiva.

L'idoneità riproduttiva del toro si baserà solo su due test di laboratorio: motilità progressiva dello sperma e morfoanomalie dello sperma. A questi due test si aggiungono la misurazione della circonferenza scrotale, la valutazione dello stato di salute e, diversi test di libido. Queste normative o guide presentano vantaggi e limitazioni. Il BSE è una guida che evita la pressione sul veterinario durante gli esami di compravendita ed evita il rischio di introdurre uno toro sterile (o sub-fertile) a un gruppo di femmine nell'immediata stagione riproduttiva. Il rispetto di queste normative garantisce la conformità con un protocollo diagnostico che è stato certificato da un'organizzazione esterna competente e prestigiosa. Questa organizzazione elabora lo standard sulla base delle attuali prove scientifiche ed è modificabile. La classificazione si basa sulla valutazione fisica e sulla capacità del toro di soddisfare il minimo di sviluppo testicolare, motilità e morfologia normale degli

spermatozoi, ma la libido non viene regolarmente valutata. Una buona libido tuttavia, non garantisce che un toro sia altamente fertile, né che sia privo di virus o altri agenti.

Questi regolamenti hanno anche i loro limiti quando si tratta di emettere una previsione. Pertanto, la diagnosi globale e la prognosi della idoneità riproduttiva di un toro devono tener conto, oltre dei test di laboratorio, della misurazione della circonferenza scrotale, dell'esame ecografico, dell'anamnesi, dello stato clinico generale, dei test sanitari e della capacità di montare.

#### 1.2.4 Performance test

I test eseguiti durante il Performance test sono i seguenti:

- K-caseina: per ogni animale viene denominato il genotipo della K-caseina.
- Cariotipo: si controlla il cariotipo per rilevare eventuali anomalie cromosomiche.
- Tare genetiche: si eseguono nel caso non siano potute essere eseguite prima dell'ingresso.
- Valutazioni morfologiche e rilevazioni biometriche: hanno lo scopo di verificare che i tori corrispondano, per quanto riguarda l'armonicità e sviluppo della struttura, allo standard di razza. Tali valutazioni sono effettuate all'entrata e all'uscita dell'animale. Le misurazioni sono invece eseguite per controllare il corretto accrescimento del soggetto.
- Incrementi ponderali: i torelli vengono pesati all'arrivo, prima della partenza e durante la permanenza al centro ogni mese.
- Prelievo del seme: addestramento ai salti e valutazione delle prestazioni dei tori dall'inizio della pubertà. Si effettuano poi, una volta a settimana per 6 settimane.
- Analisi del seme: Il seme prelevato viene analizzato nelle sue caratteristiche principali (concentrazione, volume, motilità, vitalità, morfologia).

Per ogni salto vengono rilevati e registrati il volume, concentrazione e motilità dell'eiaculato.

Il volume viene misurato tramite bilancia. Per ogni salto, si posano 3,0 µl della soluzione precedentemente preparata (25 µl di seme + 75 µl di diluente) sul vetrino della camera di Makler, posto su una piastra riscaldante a 37°C.

Attraverso un analizzatore automatico di immagine (ANDROVISION®), collegato tramite telecamera al microscopio, vengono rilevati i dati di concentrazione e valutata la motilità progressiva e totale (circa 200 cellule), e contemporaneamente i dati vengono registrati.

Parte della soluzione viene utilizzata per allestire i vetrini di controllo per le valutazioni morfologiche (eseguite per ogni sessione di salto), i dati relativi alla valutazione morfologica del seme vengono registrati nell'apposito database (ANDROVISION®).

Alla quarta sessione di salto vengono prodotte e congelate 20 paillettes del primo eiaculato del soggetto che sta terminando il Performance Test.

Le paillettes vengono stampate, utilizzando un'apposita stampante gestita da un software specifico (EASYCODER®), il quale produce 20 paillettes per ogni toro, ognuna delle quali riporta i seguenti dati:

- Codice aziendale;
- Matricola;
- Nome;
- Data di congelamento.

Il seme una volta diluito verrà posto nel banco frigo ad una temperatura di 5°C per almeno due ore.

A fine sessione di salto viene infilato il paillettes il seme diluito del primo e secondo eiaculato dei tori in produzione e lo stesso viene congelato e stoccato. Le paillettes vengono stampate, utilizzando un'apposita stampante gestita da un software specifico (EASYCODER®) e per ogni toro vengono riportati i dati precedentemente elencati.

### 1.2.5 Attività di salto

Con questo test si addestrano i nuovi torelli e si ha modo di verificare le attitudini di essi per quello che riguarda la produzione del seme (quantità e qualità) e la loro libido. Questa è una fase molto importante per quanto riguarda il percorso di un torello al Centro genetico. La buona riuscita di questa operazione potrà influire significativamente sul futuro del soggetto.

I tori iniziano i salti una volta alla settimana per un periodo di 6 settimane. Il giorno del salto viene formulato l'elenco dei tori che dovranno compiere l'attività di salto. Nell'elenco sono inclusi i torelli in addestramento, e cioè i soggetti che compiranno gli 11 mesi nella settimana successiva. Questi ultimi sono i nuovi candidati che entrano nel programma di salto, e con una settimana circa, di anticipo, vengono esercitati all'azione meccanica del salto. Tutti i soggetti presenti in elenco vengono bloccati nei loro box e condotti in zona salti, attraverso i corridoi predisposti, con l'aiuto di una corda. Una volta che i torelli sono giunti in zona salto vanno effettuate le rilevazioni delle misure testicolari. Successivamente si sceglie il toro ruffiano, il quale poi verrà bloccato nella postazione fissa e verrà sostituito da un altro toro dopo 5-6 salti.

Il toro in questione viene scelto in base a determinati criteri quali: docilità e tranquillità e in base alle sue dimensioni che devono essere più o meno compatibili con quelle degli altri soggetti.

A questo punto si passa alla fase di prelievo mediante l'utilizzo delle vagine artificiali precedentemente preparate.

Molto importante è il riempimento di acqua della vagina la cui temperatura si dovrà aggirare tra i 40°- 42°C. Per mantenere costante la temperatura si ripongono le vagine in una stufa termostata e le si estraggono solo nel momento del loro utilizzo. Un'altra caratteristica importante è la pressione che deve essere tale da permettere il completo e sensibile avvolgimento del pene dell'animale durante la fase di eiaculazione.

Prima del prelievo i soggetti devono eseguire una o due false monte per raggiungere la massima eccitazione (aumentando così la libido e la quantità di seme prodotta).

Durante la falsa monta con la maggior rapidità possibile, si deve deviare molto delicatamente il pene dell'animale in modo da evitare che possa urtare violentemente contro il ruffiano, evitando eventuali traumi o lesioni.

Per il prelievo ufficiale, dopo le false monte si recupera la vagina (diversa per ogni soggetto) nella stufa e si procede con l'operazione.

Nel momento in cui il toro si presta ad eseguire il salto, sempre in modo rapido e con cautela si va a posizionare la vagina. All'atto del salto oltre alla rapidità e prontezza di riflessi è necessaria una certa coordinazione. Bisogna prestare attenzione ai movimenti dell'animale, in quanto se eccessivamente bruschi o esuberanti, potrebbero andare a colpire o urtare l'operatore.

A operazione conclusa la vagina deve essere agitata per permettere che tutto il contenuto confluisca nella provetta di raccolta; dopodiché si passa all'analisi in laboratorio del seme raccolto.

Dopo aver effettuato il secondo salto il toro viene riportato nel proprio box.

Alla fine delle 4 settimane di test viene emessa una valutazione:

- Favorevole: il toro viene abilitato alla fecondazione artificiale.
- Riserva: il giudizio viene sospeso, il toro può entrare in un centro FA, tuttavia l'abilitazione viene emessa solo nel caso in cui la qualità seminale raggiunga parametri idonei.
- Sfavorevole: il toro non viene abilitato alla FA e viene macellato.

Attività prima della sessione di salto

Il tecnico prima della sessione di salto stampa da GLOBAL l'elenco dei tori ai salti seguendo i seguenti passi operativi:

- Programma GLOBAL;
- Archivio: Centro Genetico;
- Stampe;
- Stampe Database;
- Elenco settimanale tori da salto;
- Nei criteri di ricerca va aggiornata la data di effettuazione dei salti ;

- Il risultato dell'estrazione sarà l'elenco dei tori che dovranno essere presenti alla sessione di salto.

#### Procedure di salto

Il tecnico accende il timer della stufa la sera precedente, dopo aver posto a scaldare un numero di vagine corrispondenti a quella dei soggetti in programma di salto, più una o due.

La temperatura interna delle vagine dovrebbe essere periodicamente controllata, verificando che si aggiri tra i 40°C e i 42°C. É molto importante il riempimento d'acqua delle vagine, che deve essere tale da permettere il completo e sensibile avvolgimento del pene dell'animale durante la fase di eiaculazione.

Il tecnico stampa l'elenco giornaliero dei torelli al salto, che viene consultato dalla biologa e dagli operatori stessi. Ogni soggetto eseguirà, durante il performance test, quattro sessioni di salto settimanali durante le quali sarà raccolto per due volte il prodotto dei due eiaculati.

Gli operatori del Centro Genetico bloccano nei box i tori presenti in elenco, inclusi i tori in addestramento, e cioè i soggetti che compiranno gli 11 mesi nella settimana successiva, e li conducono in zona salto, movimentando con corda (gli operatori devono sempre essere in coppia per movimentare i tori sia in entrata che in uscita dalla sala monta).

Dopo aver stabilito quale toro farà da manichino, che sarà bloccato nella postazioni fissa (sarà sostituito da un altro soggetto dopo 5 o 6 salti), vengono rilevate le misure testicolari e i pesi dei soggetti che in quella settimana compiono gli 11 o 12 mesi di età.

Prima del prelievo i soggetti devono eseguire una o più di una falsa monta per raggiungere la massima eccitazione.

L'operatore inserisce una provetta all'apice del cono di raccolta per il primo eiaculato si utilizza una provetta di plastica e per il secondo una di vetro (entrambe di vetro se si tratta di seme da congelare al sesto salto del soggetto).

Tra il primo e il secondo prelievo dovrebbe passare almeno 10 minuti e il soggetto, specialmente se alla prima sessione di salto, non dovrebbe subire traumi legati al momento (come cadute o atteggiamenti violenti, o prelievi troppo decisi o eseguiti non nel momento di massima eccitazione).

La falsa monta per il secondo prelievo va consentita al soggetto solo quando l'operatore che esegue il prelievo ha preparato la vagina, per consentirgli il controllo del momento giusto.

Ad ogni prelievo la vagina va utilizzata protetta dal manicotto di feltro e riposta poi in stufa per mantenere la temperatura corretta, e riutilizzata esclusivamente per lo stesso soggetto per il secondo salto.

È opportuno che i tori, che hanno terminato i salti, vengano spostati dai box singoli a quelli multipli, in modo da lasciare posto a quelli nuovi; lo scambio deve essere fatto il giorno dei salti nel momento in cui il toro viene ri-accompagnato nel box.

È bene effettuare il giorno prima dei salti una alimentazione doppia in modo da non perdere tempo, come pure stendere la segatura nella zona salto.

#### 1.2.6 Metodi di collezione del seme

##### a. Elettroeiaculazione

Consiste in una sonda ad elettrodi che scaricano una corrente di 12 volt, inserendo lo strumento nell'ampolla differenziale, determina la contrazione delle vescichette e infine l'eiaculato. Determina meno concentrazione di un seme raccolto con vagina artificiale perché la contrazione delle vescichette determina lo svuotamento del testicolo.

##### b. Tecnica di stimolazione

L'uretra pelvica viene massaggiata per circa 30-60 secondi in preparazione alla raccolta del seme. L'area sopra l'ampolla, la prostata e l'uretra vengono massaggiate spostando le dita con un movimento in direzione longitudinale. La stimolazione diventa evidente dalla pulsazione del muscolo uretrale. Gli stimoli dovrebbero durare 1-2 secondi e quindi essere interrotti per circa 0,5 secondi prima che venga applicato

lo stimolo successivo. Quando il fluido emesso inizia a diventare torbido, il cono di raccolta viene posizionato sopra il pene e viene raccolto il campione.

#### c. Massaggio

Il seme può essere raccolto mediante il massaggio transrettale. L'operatore inserisce la mano nel retto, e dopo aver esaminato le ghiandole accessorie, viene applicato un massaggio longitudinale principalmente sulle ampolle, la prostata e periodicamente sull'uretra.

Questo metodo può indurre ad alcuni svantaggi: l'irritazione della mucosa rettale, la protrusione incompleta del pene, la necessità di una seconda persona per raccogliere il campione di sperma e la difficoltà di stimolare tori agitati. Inoltre con questo metodo il numero di tori per sessione è limitato.

#### d. Vagina artificiale

Questo metodo viene eseguito quasi esclusivamente nei centri tori. Può essere utilizzato per animali che hanno testicoli ed epididimi normali ma che producono poco sperma o non producono con il metodo di elettroeiaculazione. La vagina viene preparata riempiendo la guaina con acqua ad una temperatura dai 42°- 50°C. Può essere aggiunta aria per aumentare la pressione. La vagina viene lubrificata con un gel sterile non spermicida. Quando il toro salta, l'operatore deve essere pronto a dirigere il pene all'apertura della vagina artificiale.

### 1.2.7 Metodi di congelamento del seme

Il seme viene diluito, con il mestruo diluente mantenuto a 37°C, in base ad un calcolo che tiene conto del volume, della concentrazione, del tipo di paillettes utilizzate per il confezionamento (possono essere medie o mini e i volumi variano da 0,25 ml a 0,50 ml), dei milioni di spermatozoi per dose che sono stabiliti dalla specifica di produzione del laboratorio.

Di questo eiaculato vengono confezionate solo 20 dosi mini, conservate per eventuali analisi genetiche e non per la valutazione del congelamento che, invece, viene valutata a fresco.

Dopo aver controllato a fresco la qualità seminale si diluisce l'eiaculato con volume di diluente a 37°C calcolato come sopra descritto e si pone la provetta nella vetrina refrigerata a 4°C.

Attendere almeno due ore dalla diluizione e confezionare le paillettes.

### 1.3. Requisiti fisici del riproduttore

#### 1.3.1 Anatomia dell'apparato riproduttore

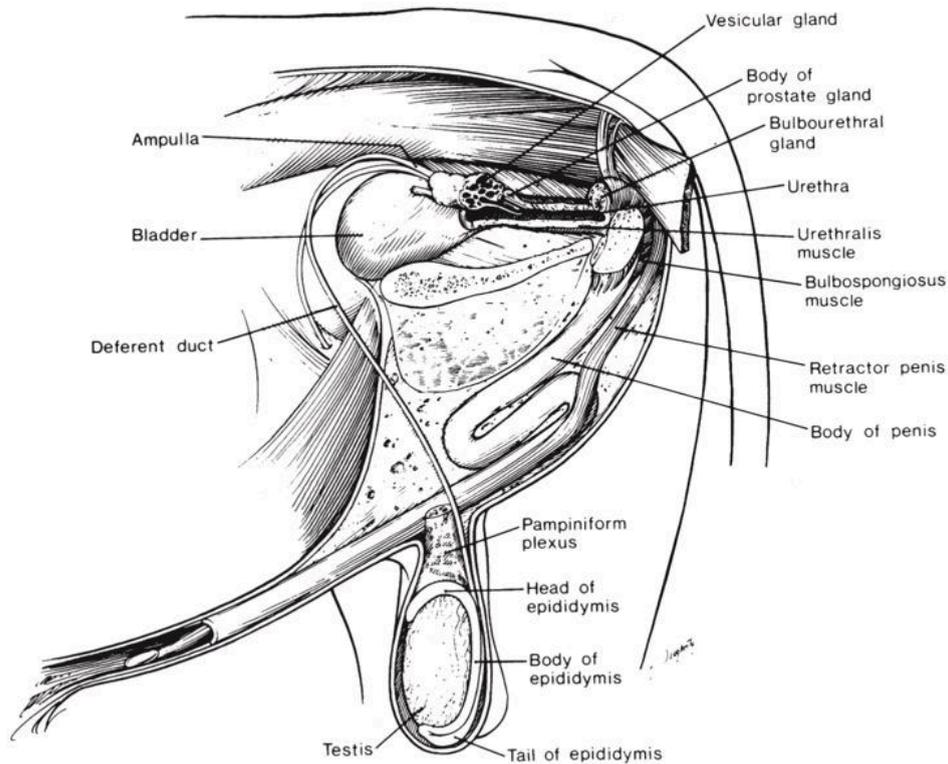
Si tratta della seconda selezione, in cui si analizza l'anatomia per valutare le capacità riproduttive dei giovani riproduttori.

Gli organi riproduttivi del toro maturo includono testicoli accoppiati, ciascuno con un cordone spermatico, un epididimo e i dotti deferenti, che terminano con l'ampolla. Inoltre sono accoppiate le ghiandole vescicolari, una ghiandola prostatica e le ghiandole bulbouretrali accoppiate (di Cowper), e un pene fibroelastico, che incorpora una flessione sigmoide (Fig. 3-1). Queste ghiandole sono indicate come ghiandole sessuali accessorie.

Il prepuzio è una doppia invaginazione della pelle, con un rivestimento interno che si trova all'apice del pene e ne riveste gran parte della superficie. Un muscolo del prepuzio, a forma di ventaglio, solleva e abbassa la porzione distale del prepuzio e controlla le dimensioni dell'apertura prepuziale. La retrazione, invece, è sotto il controllo del muscolo del prepuzio retrattore.

I testicoli sono sospesi all'interno dello scroto, che ha la caratteristica di fornire la termoregolazione testicolare. All'interno del testicolo, la maggior parte del parenchima è composta da tubuli seminiferi (cellule del Sertoli e strati di cellule germinali). Il resto è costituito da tessuto interstiziale (cellule di Leydig, vasi sanguigni e linfatici e tessuto connettivo). Il mediastino, un'area di tessuto connettivo che si estende longitudinalmente nella metà del testicolo, contiene vasi sanguigni e tubuli del retestico. Il parenchima testicolare è racchiuso in una spessa capsula di tessuto connettivo (tunica albuginea), che è, a sua volta, coperta da una membrana sottile e sierosa (tunica vaginale propria). Gli spermatozoi sono prodotti all'interno

dei tubuli seminiferi. Entrambe le estremità di ciascun tubulo forma tubuli retti (o dritti), che si uniscono alla rete testicolare (un' insieme di spazi di anastomosi all'interno del mediastino testicolare). Lo spermatozoo passa dalla rete testicolare alla testa dell'epididimo attraverso i dotti deferenti. L'epididimo è un dotto allungato e tortuoso che comprende le regioni della testa, del corpo e della coda.



*Fig. 3-1 Organi riproduttivi del toro (Amann RP: How a bull works. Proceedings of the 11th Technical Conference on A. I. and Reproduction (NAAB), 1986)*

### 1.3.2 Epididimo

L'epididimo è molto più di un organo passivo, con importanti funzioni. Gli spermatozoi che lasciano il testicolo non hanno sia la capacità di sopravvivere nel tratto femminile che di ottenere la fecondazione non assistita. Queste capacità sono acquisite nell'epididimo. Le funzioni epididimali includono (1) lo stoccaggio efficiente dal punto di vista energetico dello sperma mantenendo la fertilità degli spermatozoi; (2) miscelare gli spermatozoi recentemente formati con i più vecchi per fornire uno spettro temporale di funzione ottimale dello sperma e (3) modificare gli attributi e l'ambiente degli spermatozoi per consentire la sopravvivenza e garantire la capacità di fecondazione all'interno del tratto femminile.

Gli spermatozoi immotili vengono trasportati nel lume del tubulo seminifero in seguito alla separazione delle loro connessioni con le cellule del Sertoli. La maggior parte del citoplasma residuo viene trattenuta dalla cellula del Sertoli, anche se una parte rimane adesa agli spermatozoi (come gocce citoplasmatiche).

Il trasporto iniziale nella rete testicolare e nella testa dell'epididimo sembra dipendere dal fluido secreto dalle cellule del Sertoli. Una volta nei dotti efferenti, il movimento degli spermatozoi è facilitato dalle cellule epiteliali ciliate (all'interno dei dotti) e dalle contrazioni della muscolatura liscia. I dotti efferenti e il segmento iniziale della testa epididimale ri-assorbono la maggior parte del fluido e delle proteine, secernendo nuovi composti.

La maturazione degli spermatozoi avviene all'interno della testa e corpo dell'epididimo. Questo processo richiede la secrezione coordinata di enzimi e proteine specializzate. Durante il processo, si verificano cambiamenti nel complesso DNA-proteina, nella membrana plasmatica, nei mitocondri, nel complesso assonemico, nelle membrane acrosomiali e nelle caratteristiche della superficie degli spermatozoi.

Man mano che gli spermatozoi progrediscono attraverso l'epididimo, raggiungono una motilità progressiva, la goccia citoplasmatica migra dalla posizione prossimale a quella distale al centro dello spermatozoo e i fluidi seminali vengono riassorbiti e scambiati.

La regione della coda funge da regione di stoccaggio per lo sperma, in modo che un toro maturo può avere riserve epididimali che rappresentano l'equivalente di 6-7 giorni di produzione giornaliera di sperma. La maggior parte degli spermatozoi che non vengono eiaculati vengono svuotati nelle urine, con una porzione riassorbita dal tratto maschile. Esistono alcune prove per il riassorbimento selettivo degli spermatozoi all'interno dell'epididimo.

Gli spermatozoi vengono trasportati dalla coda dell'epididimo all'uretra dai dotti deferenti tramite contrazioni muscolari che sono più forti durante la stimolazione pre-coitale. Le porzioni terminali dei dotti si espandono per formare le ampolle. Queste agiscono come aree minori di stoccaggio dello sperma e secernono anche fruttosio e acido citrico nel plasma seminale. I dotti deferenti si aprono nella porzione craniale dell'uretra pelvica. Anche le ghiandole vescicolari (o vescicole seminali) si aprono nell'uretra pelvica. Queste ghiandole forniscono gran parte della componente fluida dell'eiaculato del toro, così come i nutrienti dello sperma e i tamponi di sperma. La ghiandola prostatica, costituita da un corpo relativamente piccolo e da una regione di diffusione più grande, produce il 25-40% del volume seminale. Le ghiandole bulbouretrali si aprono ciascuna nell'uretra pelvica all'arco ischiale. L'uretra è un tubo allungato che si estende dalla vescica alla punta del pene. È circondato dal muscolo uretrale, che si contrae fortemente durante l'eiaculazione.

### 1.3.3 Libido

La libido è definita come “la disponibilità e l'entusiasmo” di un toro di cavalcare e servire, mentre la capacità di accoppiamento si riferisce alla capacità e competenza del toro nel soddisfare questa aspirazione. La capacità di servizio è una misura che include sia aspetti della libido che della capacità di accoppiamento.

I fattori che influenzano maggiormente la libido sono: effetti sull'età e sull'allevamento (1), l'età o l'esperienza di un toro possono influenzare la relativa efficienza di monta, e di conseguenza i loro punteggi e classifiche della libido. Il rapporto toro-femmina (2), la raccomandazione standard dice di utilizzare un toro per 20-30 femmine. È evidente che questo non rappresenta l'uso ottimale del toro e che

consente ai tori sub-standard di passare inosservati. Effetti sociali (3), la classifica sociale dei tori all'interno dei gruppi può influenzare la loro attività sessuale. Se nella mandria vi è un toro dominante (per età e peso) allora potrebbe compromettere la fertilità della mandria, impedendo ai tori meno dominanti di servire. Differenze genotipiche (4), si nota come per le diverse razze vi sia una diversa libido e capacità riproduttiva.

Il test che viene effettuato per esaminare la libido comprende delle valutazioni specifiche:

- valutazione dei tori maggiormente agitati o tranquilli;
- valutazione dei tori immediatamente dopo altre procedure come elettroeiaculazione, vaccini e misure di controlli dei parassiti;
- valutazione dei tori in condizioni ambientali sfavorevoli, come caldo e freddo;
- valutazione dei tori in gruppi in cui uno o più tori sono dominanti e/o gruppi con età molto diverse;
- uso di stimoli inadeguati;
- diffusione di malattie veneree;
- presenza di malattie, lesioni o stress.

#### 1.3.4 Comportamento sessuale

I tori possono variare considerevolmente nella libido e nella capacità riproduttiva (capacità di cavalcare e riprodursi con successo), entrambi i tratti hanno forti influenze genetiche. I moderni sistemi di gestione, sia che impieghino l'allevamento naturale o artificiale, possono perpetuare carenze nella libido del toro e nella capacità riproduttiva. Questa capacità viene acquisita dai giovani tramite l'attività di montaggio. Nonostante tale comportamento, i giovani tori cresciuti in gruppi di soli maschi spesso mostrano segni di inesperienza sessuale.

La libido è soggetta a varie influenze tra cui problemi fisici come zoppie, obesità, presenza di un'ernia, anomalie del pene e malattie respiratorie.

Le diete ad alta energia possono ridurre la libido del toro, mentre la scarsa alimentazione è deleteria solo quando è abbastanza grave da influenzare il benessere fisiologico del toro.

La capacità di servizio è una misura del numero di servizi raggiunti da un toro in condizioni definite e quindi include aspetti sia della libido che della capacità di accoppiamento. Sono stati sviluppati metodi di test per quantificare sia la libido che la capacità di servizio.

Gli ormoni steroidei avviano la motivazione sessuale, le buone relazioni tra i livelli circolatori di questi ormoni e le stime quantitative del comportamento sessuale nei tori si sono rivelate sfuggenti. L'età del toro e l'esperienza sessuale possono influenzare l'efficienza relativa dell'accoppiamento e quindi i punteggi e le classifiche della libido. Una componente di apprendimento per la capacità riproduttiva dei giovani tori è stata descritta in alcuni studi, anche se l'inesperienza viene rapidamente superata a seguito di un'adeguata esposizione alle femmine. Sono necessarie ulteriori ricerche per differenziare gli effetti dell'età e dell'inesperienza sulla libido del toro. I punteggi della libido hanno generalmente mostrato scarse relazioni con i punteggi di solidità riproduttiva, la circonferenza scrotale, la qualità dello sperma, le dimensioni delle ghiandole vescicolari, il rango di dominanza, il guadagno medio giornaliero e le concentrazioni nel sangue a riposo di testosterone o LH. La valutazione completa del toro comprenderà lo stato fisico, dei genitali interni ed esterni, la qualità seminale e le capacità riproduttive.

#### 1.4 Qualità seminale

La valutazione del materiale seminale raccolto è un passaggio fondamentale dopo la raccolta del seme stesso, del processo che si concluderà poi con l'inseminazione artificiale. È l'unico test affidabile per stabilire la potenzialità riproduttiva del soggetto in esame. Purtroppo non è sempre praticabile e molto dispendiosa in termini di tempo; in questo caso il ricorso ad altre metodiche è indispensabile.

La valutazione si può dividere in analisi macroscopica, con parametri: volume, viscosità, colore ed eventuale presenza di materiale estraneo (pus, sangue,

coaguli...); e analisi microscopica, con parametri: concentrazione, cinetica, spermatozoi vitali e non vitali, e citomorfologia.

#### 1.4.1 Spermatogenesi

La spermatogenesi è la somma delle trasformazioni cellulari che avviene nell'epitelio seminifero e il risultato è la produzione di spermatozoi (Fig. 4-1). Il processo di differenziazione cellulare inizia con gli spermatogoni e procede attraverso diverse divisioni mitotiche, una divisione meiotica, e numerose trasformazioni citologiche, prima finendo come spermatidi allungati.

Il testicolo è in gran parte composto da tubuli seminiferi e tessuto interstiziale. Quest'ultimo si trova tra i tubuli seminiferi ed è costituito principalmente da cellule del Leydig, che producono e secernono ormoni steroidei, nonché dei vasi vascolari e linfatici che forniscono il parenchima testicolare. I tubuli seminiferi derivano dai cordoni sessuali primari e contengono cellule germinali, così come le cellule del Sertoli, che supportano e nutrono la produzione di sperma. Le cellule del Sertoli formano giunzioni strette, creando la parte più importante porzione della barriera sangue-testicolo. La spermatogenesi si verifica principalmente nella sezione del tubulo contorto dei tubuli seminiferi. Questi tubuli sono circondati da cellule peritubulari contrattili che promuovono il flusso fuori dal tubulo contorto nel retto (porzione dritta) del tubulo seminifero. Entrambe le estremità di ciascun tubulo sono collegate alla rete testicolare.

La spermatogenesi può essere divisa in tre fasi e la durata è di circa 61 giorni.

La prima fase, la proliferazione (1), è costituita da 6 divisioni mitotiche degli spermatogoni, aumentando il numero di A-spermatogoni e poi B-spermatogoni. Una parte importante di questa fase è il ritrovamento delle cellule staminali. La perdita di ponti intercellulari consente agli spermatogoni di tornare alle cellule staminali. Il B-spermatogone subisce diverse divisioni mitotiche, con l'ultima divisione che si traduce in spermatociti primari. La fase meiotica (2) inizia con gli spermatociti primari diploidi. Durante la meiosi, la diversità genetica è assicurata dalla replicazione del DNA e dall'incrocio durante la produzione di spermatociti secondari e, di

conseguenza, da un punto di vista genetico, non ci saranno due spermatozoi identici.

Nell'ultima fase, nota come la fase di differenziazione (3) o spermiogenesi, avviene la differenziazione di uno spermatide sferico indifferenziato in uno spermatozoo completamente differenziato con una testa, un flagello che include la porzione centrale e la coda. La durata della spermiogenesi differisce tra le specie; nel toro ci vogliono gli ultimi 18 giorni perchè lo stadio di spermiogenesi della spermatogenesi sia completato.

Alcuni termini sono rilevanti per comprendere questo processo:

- Resa Giornaliera di Spermatozoi (RGS): numero di spermatozoi raccolti al giorno. RGS non è solo una funzione della produzione di seme, ma influenza anche la frequenza di eiaculazione, la stimolazione del toro e metodo di raccolta;
- Produzione giornaliera di Spermatozoi (PGS): numero totale di spermatozoi prodotti al giorno dai testicoli. La PGS viene solitamente valutata da un esame istologico dei tessuti testicolari oppure preparando un omogeneo conteggio delle cellule. Un approccio meno invasivo è la determinazione degli spermatozoi totali negli eiaculati di maschi in cui le riserve di sperma extragonadiche sono state stabilizzate da una frequenza eiaculatoria.

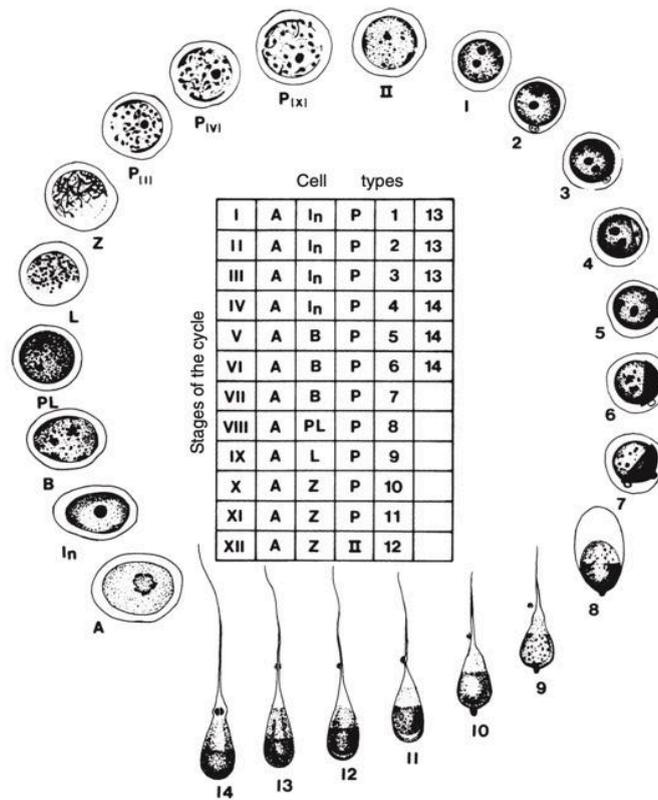


Fig 4-1 Spermatogenesi di un toro. Rappresentazione diagrammatica di una categorizzazione a 12 stadi del ciclo (I-XII) e dei tipi di cellule coinvolti tra cui spermatogoni (A, In, e B), spermatociti primari e secondari (II), e i diversi stadi della spermatogenesi (1-14), mostrando cambiamenti acrosomiali e morfologici. (Reproduction in farm animals, 5th ed. Baltimore: Williams & Eikins, 1987)

#### 1.4.2 Controllo endocrino

La normale funzione testicolare dipende da un adeguato controllo endocrino, autocrino e paracrino. Nel maschio l'ormone del rilascio della gonadotropina (GnRH) viene secreto dall'ipotalamo in natura pulsatile con conseguente rilascio di ormone luteinizzante (LH) e ormone follicolo-stimolante (FSH). L'LH agisce sulle cellule del Leydig all'interno del testicolo, che sono responsabili della sintesi del progesterone, la maggior parte dei quali viene convertita in testosterone. Questa natura pulsatile dell'LH è necessaria per la normale funzione testicolare, in quanto l'LH sostenuto può portare da una natura refrattaria delle cellule del Leydig secondarie a una bassa regolazione nel numero dei recettori.

Ciò culmina in una ridotta secrezione di testosterone delle cellule di Leydig. Alte concentrazioni di testosterone devono essere mantenute per la normale spermatogenesi. Il rilascio pulsatile di LH e di conseguenza il testosterone impedisce l'inibizione negativa dell'FSH, che è necessario per il mantenimento delle cellule del Sertoli. Queste ultime convertono il testosterone in diidrotestosterone ed estradiolo insieme alla proteina legante androgeni (ABP).

Circa l'80% dell'ABP secreto va nel lume del tubulo seminifero e viaggia verso l'epididimo, mentre il resto viene secreto nel compartimento interstiziale e viene assorbito nella circolazione sistemica. L'ABP lega il testosterone ed è responsabile non solo del mantenimento di un'alta concentrazione di testosterone all'interno dei testicoli, ma porta anche il testosterone all'epididimo.

Le cause più comuni di spermatogenesi anomale nei maschi includono termoregolazione testicolare anomala; squilibri ormonali, in particolare quelli associati allo stress; ed effetti di tossine o espressione di geni deleteri. Lo stress principalmente eleva le concentrazioni sistemiche di cortisolo, diminuendo profondamente il rilascio di LH e testosterone. Lo stress ha molte origini, tra cui l'ambiente, la malattia o le lesioni, causando cambiamenti nello spermiogramma simili a quelli indotti dall'interruzione della termoregolazione. Lo spermatocita primario è estremamente sensibile alle alterazioni nell'ambiente ormonale per stress o malattie.

### 1.4.3 Spermatozoo

Il seme bovino è formato da spermatozoi sospesi nel plasma seminale. Viene fornito da testicoli, epididimi, e ghiandole accessorie (con una porzione sostanziale fornita dalle ghiandole vescicolari e prostatiche).

Il plasma seminale contiene metaboliti spermatocici (incluso fruttosio, acido citrico, glicerilfosforilcolina e inositolo), amminoacidi, enzimi, antimicrobici, ormoni, e immunoglobuline.

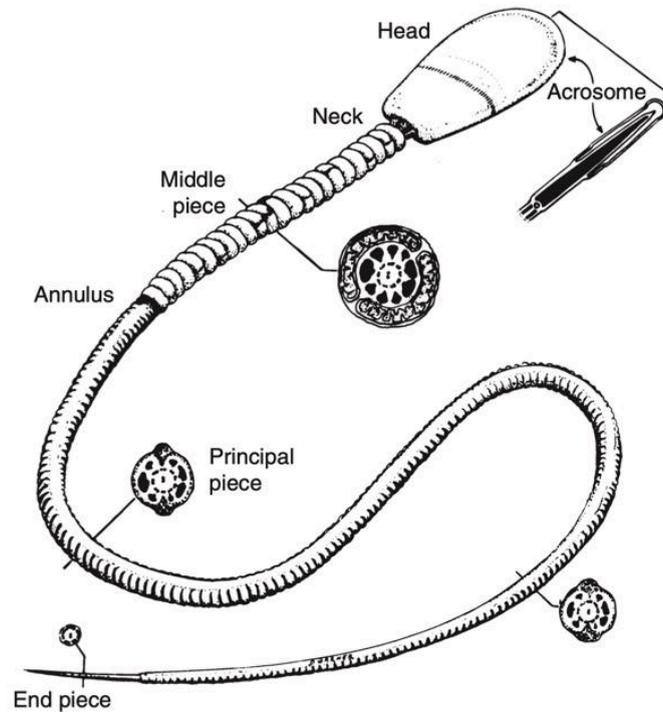
Lo spermatozoo del toro è strutturalmente simile a quello di altri mammiferi domestici (Fig. 4-2). È formato da una testa fluttuante, una parte centrale, e una coda (con una porzione principale e distale).

La testa è la porzione specializzata di cromatina condensata contenente DNA, circondata da una membrana nucleare, con un acrosoma sul suo aspetto anteriore. La forma della testa è ovale, per facilitare la progressione nelle varie secrezioni dell'apparato genitale femminile. La porzione anteriore della testa è circondata dall'acrosoma, costituito da una membrana interna ed esterna, con interposta una matrice che contiene vari enzimi idrolitici. Questi enzimi intervengono durante la fecondazione e vengono liberati con la reazione acrosomiale, ultima fase del processo di capacitazione che avviene nel tratto genitale femminile.

Il collo è formato dal centriolo prossimale, dal segmento di connessione, placca densa posta in convessità alla base del nucleo, e da una serie di colonne segmentate fibrose, che si continuano con le fibre dense esterne.

La parte intermedia è costituita dall'assonema. Questo è composto da 9 paia di filamenti o microtubuli disposti circolarmente intorno a due filamenti centrali; il tutto viene avvolto da nove fibre dense e grossolane che sembrano essere in correlazione con le nove doppiette dell'assonema.

Terminata la parte intermedia, con un anello denso, le fibre dense sono ricoperte da una guaina fibrosa, composta da una serie di coste trasversali e da due lunghi ispessimenti longitudinali che vanno fondendosi con due fibre dense esterne che da nove diventano sette. La parte terminale è composta solamente dalla membrana plasmatica che circonda l'assonema.



*Fig 4-2 Le regioni principali (testa, zona intermedia, e coda) dello spermatozoo bovino. Le sezioni sagittali mostrano la relazione tra l'acrosoma e la testa dello sperma, nonché i dettagli strutturali del pezzo principale e la sua relazione con la guaina mitocondriale della zona intermedia (Reproduction in farm animals, 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1987)*

#### 1.4.4 Trasporto del seme ed eiaculazione

Gli spermatozoi immotili sono portati nel lume dei tubuli seminiferi dopo la separazione delle loro connessioni con le cellule del Sertoli all'interno dell'epitelio spermatogenico.

Molti residui citoplasmatici vengono trattenuti dalle cellule del Sertoli, sebbene rimangano alcuni residui attaccati allo spermatozoo (gocce citoplasmatiche).

Il trasporto iniziale nei testicoli sembra dipendere dal fluido prodotto dalle cellule del Sertoli. Una volta dentro i dotti efferenti, il movimento degli spermatozoi è facilitato dalle cellule epiteliali ciliate (nei dotti) così come dalle contrazioni fluide dei muscoli.

Il trasporto degli spermatozoi nell'epididimo è dovuto dalle contrazioni muscolari. Man mano che gli spermatozoi progrediscono attraverso l'epididimo, raggiungono la capacità di essere progressivamente motili, le gocce citoplasmatiche migrano dalla posizione prossimale a quella distale nella porzione centrale dello sperma, e i fluidi vengono riassorbiti e scambiati.

L'epididimo svolge un ruolo importante nel preparare gli spermatozoi alla fecondazione. La disponibilità di testosterone, in particolare nella testa e corpo dell'epididimo, è un fattore importante nella maturazione degli spermatozoi. Al contrario la zona della coda funge da regione di stoccaggio per lo sperma.

La maggior parte degli spermatozoi che non vengono eiaculati vengono svuotati nell'urina, con una porzione riassorbita nell'epididimo.

Poi lo sperma viene trasportato dalla cauda epididimale all'uretra nei dotti deferenti (vani deferenti) attraverso contrazioni muscolari che sono più forti durante la stimolazione pre-coitale.

La porzione terminale dei dotti deferenti si espandono per formare le ampolle. Le ghiandole vescicolari (vescicole seminali) si aprono anche nell'uretra pelvica, fornendo gran parte della componente fluida dell'eiaculato, nonché nutrienti e tamponi dello sperma.

L'uretra è un tubo allungato che si estende dalla vescica alla punta del pene. È circondata dal muscolo uretrale, che si contrae durante l'eiaculazione.

Il pene del toro è fibroelastico con erezione causa un relativo aumento del diametro dello stesso. La retrazione del pene nella guaina è controllata dal muscolo del pene retrattore. Nell'atto eiaculatorio il pene raggiunge la sua massima lunghezza e pressione all'interno del corpo cavernoso. Questa pressione è dovuta dall'ingorgo vascolare causato da contrazioni ritmiche del muscolo ischiocavernoso, forzando il sangue anteriore da entrambe le crura (struttura di forma erettile a forma di V).

L'atto eiaculatorio dura circa 1,3 secondi e a volte è accompagnato dall'avvolgimento del pene. La causa dell'eiaculazione è ad opera dei muscoli addominali ed è innescata dalla stimolazione vulvare delle terminazioni nervose situate posteriormente al glande.

#### 1.4.6 Volume

Il volume del campione varia a seconda della specie, dell'età e del metodo di raccolta; dipende anche fortemente dalla stimolazione, dalla preparazione sessuale del toro e dal periodo di riposo sessuale cui è stato sottoposto.

Con un programma regolare di raccolta dello sperma utilizzando la vagina artificiale, il volume e la densità dell'eiaculato forniscono informazioni significative sulla capacità di un toro di produrre sperma. Con l'elettroeiaculazione molti fattori possono influenzare il volume e la densità dei campioni di sperma, rendendo queste caratteristiche inaffidabili per la valutazione della qualità. Il volume dello sperma viene misurato direttamente nel tubo di raccolta graduato. Si consiglia di farlo mediante pesatura e successiva conversione da peso a volume (corrispondente fattore di densità), a causa della difficoltà causata dalla presenza di schiuma e talvolta dell'inesattezza della scala graduata al momento della lettura diretta. Il volume medio di un eiaculato raccolto dalla vagina artificiale è di circa 8 ml. Un aumento del volume dell'eiaculazione è stato descritto in ragione dell'età del toro fino a 7 anni, poi rimane pressoché costante fino ai 9-10 anni.

#### 1.4.7 Concentrazione

La concentrazione spermatica è definita come il numero di spermatozoi per millilitro di eiaculato.

La concentrazione si valuta ricorrendo all'ausilio di emocitometri (camera di Burker, camera di Neubauer, o altri...), a seguito di diluizione di un'aliquota di campione con acqua distillata o fissativo. Il rapporto di diluizione varia in dipendenza della concentrazione del campione stesso, stimolandola a partire dall'esame macroscopico e dalle caratteristiche di specie. Generalmente si opta per un rapporto di diluizione tra 1:3 e 1:6.

Le camere di conteggio sono un metodo economico per il calcolo della concentrazione di spermatozoi, sebbene più lento rispetto ad altri metodi disponibili: sono necessari 10-15 minuti per campione, se viene seguito il protocollo appropriato. Queste camere sono il metodo più accurato per il conteggio degli spermatozoi poiché vengono contati direttamente. Pertanto, per la maggior parte dei laboratori e per la specie umana, rappresenta il metodo standard o "gold standard". Tuttavia vanno anche considerati alcuni limiti di questa determinazione: il possibile errore umano nel conteggio, il fatto che il numero di spermatozoi contati è limitato e il tempo che si deve dedicare a questa valutazione. Esiste una relazione tra la precisione del conteggio e il numero di spermatozoi contati: il protocollo richiede il conteggio di almeno 200 spermatozoi per campione.

I tratti seminali della densità e motilità seminale vengono descritti come: molto buono (VG), buono (G), giusto (F), o povero (P). Per la concentrazione vengono utilizzati i seguenti parametri:

VG = Il seme è cremoso e granuloso, con 750 milioni-1 miliardo o più di spermatozoi per millilitro.

G = Il seme ha un colore simile al latte, con 400-750 milioni di spermatozoi per millilitro.

F = Il seme ha un colore simile al latte scremato, con 250-400 milioni di spermatozoi per millilitro

P = Il seme è traslucido, con meno di 250 milioni di spermatozoi per millilitro

#### 1.4.8 Motilità

Gli spermatozoi si presentano in uno stato quiescente nella coda dell'epididimo. Per diventare motili, devono assumere un pH neutro, una temperatura calda, un bilancio osmotico e una concentrazione adeguata di ioni e sostanze nutritive nel liquido seminale.

É molto facile che la motilità dello sperma venga danneggiata per la contaminazione con altre sostanze spermicide o per una scorretta manipolazione. Ad esempio, i contenitori utilizzati nelle stime della motilità possono essere contaminati da residui di sapone derivanti dal lavaggio; oppure le sostanze chimiche presenti sui guanti del tecnico di laboratorio possono essere trasferite sui vetrini durante la manipolazione. Altri fattori possono essere: la rapida asciugatura o raffreddamento del seme sul vetrino o la presenza di urina e pus.

I fluidi seminali non mantengono la vitalità dello sperma per molto tempo e gli spermatozoi perdono rapidamente il loro vigore di progressione se non vengono analizzati in rapidità al microscopio. Eiaculazioni ripetute possono comportare un miglioramento della motilità degli spermatozoi per tori che non hanno eiaculato per molto tempo.

La valutazione soggettiva della motilità degli spermatozoi è soggetta ad errore umano, che ha portato allo sviluppo di metodi automatizzati oggettivi, come i "sistemi CASA". Questi dispositivi registrano sequenze video di un campione posto al microscopio e utilizzano algoritmi matematici per ricostruire la traiettoria di ogni singolo spermatozoo rilevato. Ogni sperma è classificato come mobile o immobile e viene calcolata anche la sua concentrazione.

La motilità di massa è il parametro che esprime la quantità di movimento ondoso presente in un campione di seme non diluito, in funzione sia della concentrazione dello sperma che della motilità individuale. La motilità di massa è determinata da una goccia di sperma di 5 - 10 mm di diametro, non coperta, posta su un vetrino caldo

sotto il campo luminoso del microscopio, con ingrandimento da 40x a 125x. Per aumentare il contrasto, il diaframma del condensatore deve essere chiuso o abbassato.

Per la motilità di massa vengono utilizzati i seguenti parametri:

VG = rapidi vortici scuri;

G = vortici lenti;

F = nessun vortice, ma movimento cellulare individuale prominente;

P = piccolo o assente movimento cellulare individuale.

Questo tipo di motilità dipende da tre fattori: concentrazione, percentuale di cellule progressivamente motili e velocità di progressione degli spermatozoi. Quando uno qualsiasi di questi fattori manca, il vortice previsto sarà gravemente danneggiato o eliminato. Lo sperma con giusta concentrazione può avere l'80% di spermatozoi progressivamente motili ma non mostrare nessun movimento d'onda (o vortice), mentre lo sperma concentrato può avere solo il 50% di sperma mobile e mostrare ancora un certo movimento d'onda lento. D'altra parte, lo sperma con un'ottima concentrazione ed elevata percentuale di spermatozoi progressivamente motili può avere poco o nessun movimento d'onda se la velocità della progressione spermatica è stata diminuita dalla bassa temperatura o da un intervallo di tempo prolungato tra la collezione e l'esaminazione del seme.

La motilità individuale è la percentuale di spermatozoi che si muovono, indipendentemente dalla loro velocità o modello di movimento.

La motilità individuale è determinata da una goccia di sperma di 3 - 4 mm di diametro, non coperta, posta su un vetrino caldo sotto il campo luminoso del microscopio, con ingrandimento da 200x a 500x. È molto difficile vedere la motilità individuale dello sperma, anche con diaframma chiuso o condensatore abbassato.

Per la motilità individuale vengono utilizzati i seguenti parametri:

VG = 80% - 100% motile;

G = 60% - 79% motile;

F = 40% - 59 % motile;

P = meno del 40% motile.

L'osservazione della motilità individuale e stima della percentuale di spermatozoi progressivamente motili forniranno informazioni sull'integrità della membrana dello sperma, nonché dell'integrità morfologica degli spermatozoi. Ad esempio, se un'alta percentuale di spermatozoi ha una normale motilità progressiva, allora un ritrovamento di un'alta percentuale di code piegate o spermatozoi morti indicherà una cattiva gestione del seme, piuttosto che un'anomalia intrinseca.

Allo stesso modo, la scarsa motilità è coerente con la morfologia anormale degli spermatozoi e la loro morte. Se sorgono incongruenze nelle osservazioni di motilità e morfologia, la causa dovrebbe essere stabilita. Può essere necessario ripetere la procedura di raccolta e valutazione dello sperma.

La motilità progressiva indica gli spermatozoi che si muovono attivamente, in modo lineare o in un ampio cerchio, indipendentemente dalla velocità. I dati sulla motilità progressiva si riferiscono alla percentuale di spermatozoi che si muovono in un percorso rettilineo e in avanti, rispetto al totale. Al contrario la motilità non progressiva andrà a stimare gli schemi di motilità senza progressione, ad esempio, nuotando in piccoli cerchi, la forza flagellare spostata a malapena la testa oppure quando è possibile osservare solo un battito flagellare.

### 1.5 Morfologia spermatica

La valutazione morfologica prevede un esame accurato delle caratteristiche dello spermatozoo. È bene conoscere le anomalie per verificare la presenza di spermatozoi normali o spermatozoi che presentano difetti. Nel caso si presentassero dei difetti, si potrà attribuire "compensabile" o "non compensabile" allo spermatozoo. Fondamentale, oltre al riconoscimento dei difetti, il riconoscimento dello sperma vivo o morto, grazie al metodo della fluorescenza.

Tre criteri principali devono essere presi in considerazione nella valutazione delle anomalie degli spermatozoi: (1) le anomalie del nucleo impediscono la fecondazione o lo sviluppo embrionale e non devono superare livelli >15 - 20%; (2) le anomalie dell'acrosoma e della coda non interferiscono con la capacità di fecondazione gli ovuli e quindi possono essere tollerate fino al 25%; (3) almeno il 70 - 75% degli spermatozoi deve essere esente da difetti.

La definizione di difetti primari e secondari degli spermatozoi è importante per indicare l'origine e non la gravità di un difetto. Poiché le condizioni avverse che causano entrambi i tipi di difetti possono influenzare simultaneamente la funzione epididimale e la spermatogenesi, i difetti sono indicatori di un disturbo della funzione riproduttiva.

Precedentemente lo studioso E. Blom (1950) tentò di migliorare il metodo di classificazione dei difetti degli spermatozoi con il sistema dei difetti "maggiori" e "minori". In questo sistema, i difetti maggiori sono quelli che sono stati associati all'infertilità. I difetti minori sono quelle aberrazioni degli spermatozoi che non erano associate all'infertilità al momento in cui è stato ideato il sistema. Alcuni difetti considerati minori comportano evidenti anomalie strutturali e la fecondazione o lo sviluppo embrionale sarebbero stati probabilmente impossibili utilizzando spermatozoi affetti. Alcuni esempi sono teste piccole, teste giganti e semplici code piegate (riflessi del tratto intermedio distale). All'epoca in cui fu proposto il sistema maggiore-minore, questi difetti non erano mai stati identificati in grandi numeri nello sperma, anche se molti tori erano stati esaminati nel laboratorio di Blom. Pertanto, questi difetti erano considerati minori. Come Blom aveva previsto, tuttavia, con lo sviluppo di nuove informazioni, i difetti nel sistema divennero evidenti.

#### 1.5.1 Strumentazione utilizzata per le analisi del seme

L'attrezzatura del laboratorio viene messa in funzione dal tecnico di laboratorio, e comprende: provette, pipette graduate, puntali, mestruo diluitore, cuvette, microscopio, camera di Makler, colorimetro, glicerolo, cloruro di sodio.

Mettere nel bagnetto termico, a 37°C circa, il mestruo diluitore congelato al momento della sua preparazione.

Preparazione del mestruo diluitore.

Andromed:

- mettere un matraccio con 800 ml di acqua distillata, in bagnomaria a 32-34°C;
- versare i 200 ml di diluitore concentrato negli 800 ml di acqua, risciacquare due volte il flacone del diluente con la soluzione ottenuta;
- omogeneizzare bene l'insieme, la soluzione è pronta per essere utilizzata.

Triladyl:

- mettere il flacone del diluitore in bagnomaria a 32-34°C per 10 minuti;
- mettere un matraccio con 750 ml di acqua distillata in bagnomaria a 32-34°C;
- versare 250 g di tuorlo d'uovo all'interno del matraccio contenente l'acqua distillata e omogeneizzare bene l'insieme;
- versare i 250 ml di diluitore concentrato negli 1000 ml di acqua e tuorlo d'uovo, risciacquare due volte il flacone di diluitore con la soluzione ottenuta;
- omogeneizzare bene l'insieme, la soluzione è pronta per essere utilizzata;
- mettere il flacone del diluitore in bagnomaria a 32 - 34°C per circa 10 minuti.

Se si usa il diluitore congelato, lo scongelamento va fatto il più rapidamente possibile, immergendo il flacone di soluzione congelata in bagnomaria a 32 - 34°C per 15 minuti in modo che la soluzione sia omogenea una volta che il prodotto è scongelato.

Preparare un numero di micro provette di plastica equo al numero di torelli in elenco contenenti 75 µl di diluitore al quale andranno aggiunti 25 µl di seme fresco.

La soluzione va mantenuta nel bagnetto termostato a 36°C per tutta la fase di rilevamento dati.

#### 1.5.2 Preparazione del vetrino

Gli spermatozoi sono traslucidi e praticamente invisibili alla microscopia a campo luminoso. La visualizzazione richiede quindi la colorazione degli spermatozoi o la fornitura di uno sfondo scuro per evidenziarli. Ad esempio, il rosa bengala colora gli

spermatozoi di rosa su uno sfondo chiaro, mentre l'inchiostro indiano fornisce uno sfondo scuro e tutti gli spermatozoi non si colorano e appaiono bianchi.

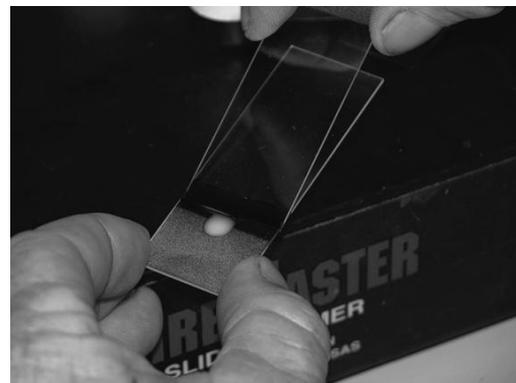
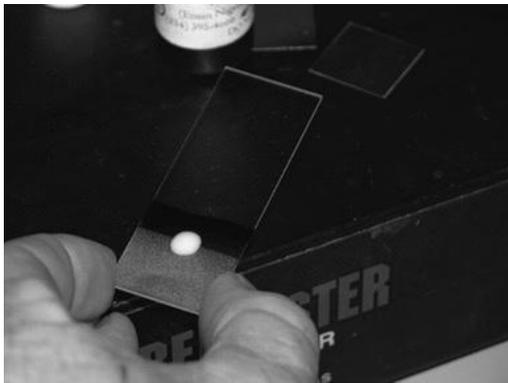
Per valutare le anomalie degli spermatozoi viene usata la colorazione eosina-nigrosina. L'eosina penetra nelle membrane cellulari danneggiate, colorando la sperma ferito o non vitale di rosa, mentre lo spermatozoo vivo respinge l'eosina e appare bianco. Quando lo sperma normale è stato maneggiato e colorato correttamente, la percentuale di colorazione dello spermatozoo vivo è altamente correlata alla motilità progressiva individuale.

Per l'implementazione del protocollo, sia i vetrini copri-oggetto che porta-oggetto che l'eosina-nigrosina sono scaldati a 37-38 °C prima dell'uso. Per fare la colorazione con eosina-nigrosina dobbiamo posizionare una piccola goccia di sperma (da 4 a 10  $\mu$ L) su un'estremità del vetrino, aggiungere un'altra goccia dello stesso volume della soluzione di eosina-nigrosina (entrambi alla stessa temperatura) e mescolare. Dopo un'incubazione massima di 30 secondi, la miscela viene distribuita sull'intero vetrino con l'aiuto di un altro vetrino porta-oggetto o copri-oggetto (Fig. 4-4). Osservare sotto un microscopio a campo chiaro o a contrasto di fase con obiettivo 100X e olio a immersione. Per lavorare con una precisione adeguata (coefficiente di variazione inferiore al 10%), almeno 200 spermatozoi devono essere valutati in ciascun campione, se presenti molte anomalie, un conteggio di 300 o più spermatozoi fornirà un conteggio differenziale più accurato.

La colorazione con eosina-nigrosina viene mantenuta a temperatura ambiente per mesi, quindi è sempre possibile effettuare una valutazione ritardata; consente inoltre di diagnosticare l'integrità strutturale del plasma e delle membrane acrosomiali. Uno sperma con una membrana plasmatica danneggiata apparirà macchiato di rosso. Allo stesso modo, anche un acrosoma danneggiato avrà lo stesso colore. Un danno significativo alla membrana di solito indica shock termici, variazioni del pH e/o osmolarità

Lo shock ipotonico è facilmente indotto da queste macchie negli spermatozoi vivi; il rischio di tale lesione deve essere ridotto al minimo asciugando le strisciate il più rapidamente possibile. L'artefatto dello shock ipotonico è facilmente riconoscibile

come un aspetto sbilanciato attorno alla porzione terminale della porzione centrale dello sperma. L'aggiunta di glucosio o TES-Tris all'eosina-nigrosina, aumenta l'osmolarità, ed è stato dimostrato che riduce il danno alle membrane spermatiche. Questa colorazione può essere usata per prevenire lo shock ipotonico nello sperma di toro.



*Fig. 4-4 Procedura di preparazione del vetrino per la colorazione con eosina-nigrosina. Posizionamento di una goccia di sperma all'estremità del vetrino. Aggiunta della soluzione di colorante. Con l'aiuto di un vetrino copri-oggetto, la goccia viene fatta strisciare in maniera longitudinale su tutto il vetrino.*

### 1.5.3 Difetti primari

Per definizione un difetto primario ha origine all'interno dei testicoli durante la spermatogenesi. I difetti primari sono quindi i difetti legati alla porzione della testa come: teste piriformi, teste staccate, vacuoli nucleari, spermatozoi macrocefalici e microcefalici, difetti dell'acrosoma e altri difetti minori.

- **Difetto della testa piriforme:** la prevalenza di questo difetto è relativamente alta ed è il difetto più diffuso in un eiaculato. Lo sperma piriforme classico ha una testa a forma di pera, un acrosoma normale e una stretta regione post-acrosomiale. Gli spermatozoi con irregolarità nella forma e nelle dimensioni della testa hanno generalmente una buona motilità. Il principale fattore scatenante di questa deformità sembra essere dato da condizioni ambientali avverse che influenzano la salute e la forma fisica maschile. Sono state notate teste piriformi o affusolate in soggetti affetti da obesità che determinano depositi di grasso nello scroto o nell'inguine, congelamento o dermatite dello scroto o altre lesioni che impediscono la corretta termoregolazione testicolare. Gli eventi stressanti possono essere correlati a condizioni meteorologiche estreme, stress abitativo o sociale, alimentazione scorretta o trasporto. Le differenze nella gravità della risposta tra maschi con trattamenti simili suggeriscono che alcuni maschi potrebbero essere geneticamente predisposti a sviluppare teste piriformi in risposta a influenze ambientali avverse. Tuttavia, dopo la rimozione dei fattori di stress, i maschi spesso tornano alla normale produzione di sperma.
- **Difetto della testa staccata:** gli eiaculati con alte percentuali di teste staccate sono associati a ridotta fertilità e in alcuni casi sterilità. Le teste staccate non vitali sono probabilmente dovute alla senescenza dello sperma normale durante la conservazione nell'epididimo o nel dotto deferente, mentre le teste anomale staccate possono essere dovute alla formazione anomala della piastra basale e/o della fossa di impianto. In alternativa, le teste staccate che sono "vive" (colorazione vitale) implicano una recente separazione della testa;

in questi casi, l'attacco della testa al pezzo intermedio è debole a causa della formazione anomala della piastra basale o della fossa di impianto, piuttosto che della senescenza.

- **Vacuoli nucleari:** questo difetto è caratterizzato da un'invaginazione della membrana nucleare nel nucleoplasma della testa dello spermatozoo. La formazione del vacuolo nucleare è stata identificata nella spermiogenesi, in particolare negli spermatidi precoci e tardivi. Ciò coincide con l'inizio della condensazione del nucleoplasma dello spermatide e con l'allungamento e l'appiattimento del nucleo. I vacuoli di solito contengono inclusioni apparentemente derivate dal citoplasma dello spermatide [29]. Sono stati postulati vari iniziatori della vacuolizzazione nucleare, tra cui stress, termoregolazione testicolare aberrante, infezioni virali, tossine, nutrizione impropria ed ereditarietà.

Quando visualizzati utilizzando la colorazione morfologica eosina-nigrosina, i vacuoli appaiono come macchie scure nel nucleo e devono essere differenziati da artefatti come cristalli di colorazione o altri detriti. I vacuoli nucleari hanno tre forme: singoli vacuoli apicali presenti ovunque nella testa dello sperma; grandi vacuoli confluenti; o più vacuoli nucleari puntiformi nella giunzione post-acrosomiale dell'acrosoma, che assomigliano a una collana di perle note come vacuoli diadema.

- **Spermatozoi macrocefalici e microcefalici:** questi spermatozoi presentano la testa chiaramente più grande o più piccola rispetto alla popolazione normale di teste dello spermatozoo. Sebbene comuni negli spermiogrammi, le teste dello sperma di dimensioni anomale non sono spesso in grandi proporzioni e ci sono informazioni ridotte riguardanti le cause. Le dimensioni anomale della testa dello spermatozoo possono essere dovute a un eccesso o a una carenza di cromatina nucleare. Pertanto, è improbabile che gli spermatozoi macrocefalici e microcefalici siano in grado di partecipare alla fecondazione dell'ovulo e allo sviluppo embrionale. L'incidenza di macrocefali

o microcefali nello spermogramma di animali con buona fertilità è quasi sempre inferiore all'1%.

- **Anomalie acrosomiali:** le aberrazioni strutturali, tra cui una cresta apicale incompleta o irregolare; una superficie acrosomiale irregolare; e acrosomi grossolanamente distorti, tra cui forme gonfie, arricciate o vacuolate, sono classificate come anomalie acrosomiali. Tutti e tre i tipi di aberrazioni acrosomiali sono stati associati all'infertilità nei tori. Il difetto acrosomiale a forma di nodo è stato descritto classicamente come un'estensione a forma di perlina all'apice dello sperma interessato o un'area di ispessimento eccentrico rifrangente o con macchie scure all'apice dello sperma interessato. L'aspetto più comune del difetto acrosomiale è l'apice dello sperma appiattito o indentato. In entrambe le forme, l'acrosoma anomalo si ripiega sull'apice dello sperma, ma solo pochi spermatozoi interessati presentano una protrusione a forma di perlina all'apice dello sperma. Si è ipotizzato che stress, termoregolazione anomala dei testicoli o cause genetiche determinano difetti acrosomiali. Le cause specifiche che portano ad acrosomi appiattiti o indentati rimangono sconosciute.
- **Altri difetti:** le teste arrotolate, le creste nucleari o la sindrome della testa gigante sono difetti rari che sono stati segnalati nei tori di Bruna Alpina, Devon e Frisona e si pensa abbiano una base genetica. Questi difetti si trovano sporadicamente in campioni di sperma normali e patologici nei tori. Le teste giganti sono spesso crestate o arrotolate lungo l'asse lungo a vari gradi e possono essere diploidi o poliploidi. Anche lo stress (ambientale, sociale o dovuto a malattia) insieme alla tossicità possono causare lo sviluppo di questa anomalia.

#### 1.5.4 Difetti secondari

I difetti secondari hanno origine nell'epididimo. Questi difetti interessano la parte intermedia e la coda dello spermatozoo, e possono essere: gocce citoplasmatiche prossimali e distali, riflesso del tratto intermedio distale, coda arrotolata e piegata.

- **Gocce citoplasmatiche prossimali:** le goccioline prossimali sono condensazioni sferiche di citoplasma che circondano il collo e il tratto intermedio prossimale dello sperma. Queste masse di citoplasma residuo si spostano lungo il tratto principale durante la spermiogenesi e l'immagazzinamento nell'epididimo e si staccano quando lo sperma viene esposto al plasma seminale durante l'eiaculazione. Un'alta percentuale di spermatozoi con goccioline citoplasmatiche prossimali in un eiaculato è associata a una funzione epididimale anomala e a una maturazione dello spermatozoo, o spermiogenesi anomala. I maschi prepuberali hanno spesso un'alta percentuale di spermatozoi con goccioline prossimali nell'eiaculato. Nei maschi maturi, la comparsa di un numero elevato di goccioline prossimali è associata a un processo degenerativo dell'epitelio seminifero.
- **Gocce citoplasmatiche distali:** le goccioline distali sono situate appena prossimalmente all'anello. Le gocce distali possono essere associate a immaturità nella maggior parte delle specie e possono indicare un disturbo nell'epididimo caudale in alcuni animali e sono spesso in presenza di altre anomalie dello sperma che corroborano la diagnosi. Nei tori, circa il 35% degli spermatozoi rilascia goccioline distali mentre si trovano ancora nell'epididimo caudale con lo sperma rimanente che rilascia la gocciolina quando si mescola con il fluido delle ghiandole sessuali accessorie. Normalmente, quando lo sperma viene mescolato con il liquido seminale durante l'eiaculazione, lo sperma diventa mobile e le goccioline vengono rilasciate dal tratto intermedio distale a causa della maggiore fluidità della membrana dello sperma sulla regione delle goccioline. Nella regione distale del tratto intermedio, la membrana si allunga per formare un gambo e poi si rompe, rilasciando un residuo non legato alla membrana di citoplasma spermatidico. Alcuni ipotizzano che la ritenzione delle goccioline citoplasmatiche distali possa essere dovuta alla mancanza di un fattore emolitico, in particolare la proteina legante i fosfolipidi, nel liquido seminale. Una teoria riguardante la causa delle

goccioline distali nell'eiaculato è l'insufficiente rilascio di liquido seminale durante l'eiaculazione.

- **Il riflesso del tratto intermedio distale (DMR):** è un'anomalia comune del tratto intermedio dello sperma nella maggior parte delle specie e l'anomalia del tratto intermedio più diffusa presente nello sperma dei tori. L'aspetto tipico al microscopio ottico è una curva nel tratto intermedio distale a forma di lettera "J". Una goccia citoplasmatica è quasi sempre intrappolata nella curva del tratto intermedio e il pezzo principale si estende oltre la testa dello sperma. Durante la valutazione della motilità, gli spermatozoi interessati spesso nuotano all'indietro e/o in cerchi stretti. Le variazioni nella curvatura determinano varie manifestazioni dello stesso difetto, tra cui una curva a forma di L e una seconda curva nella direzione opposta più prossimale nel tratto intermedio. I difetti del DMR sono dovuti a un ambiente anomalo nella coda dell'epididimo, in particolare, nel terzo distale della coda dell'epididimo. Alte concentrazioni di testosterone sono necessarie per la normale funzione dell'epididimo. Un aumento del cortisolo indotto dallo stress diminuisce la secrezione dell'ormone luteinizzante (LH) e del testosterone e interferisce con la normale funzione dell'epididimo.
- **La coda arrotolata:** è caratterizzata da un avvolgimento stretto del pezzo principale attorno a una goccia citoplasmatica a vari livelli lungo la sua lunghezza. Sebbene comunemente riscontrati durante la valutazione degli spermioigrammi, i pezzi principali arrotolati raramente superano l'1-5%. Prove sperimentali suggeriscono che questo difetto si forma durante la spermatogenesi; tuttavia, spesso appare contemporaneamente negli spermioigrammi con difetti aventi un'origine epididimale, come il riflesso del pezzo intermedio distale. Potrebbe esserci una predisposizione ereditaria per i pezzi principali arrotolati, poiché sono stati identificati diversi tori che producono il difetto in percentuali elevate.
- **La coda piegata:** è caratterizzata da una curva ad anello nel pezzo principale appena distale all'anello. Si trovano in piccole quantità, spesso in

associazione con riflessi del pezzo intermedio distale. Lo shock ipotonico può causare un difetto simile.

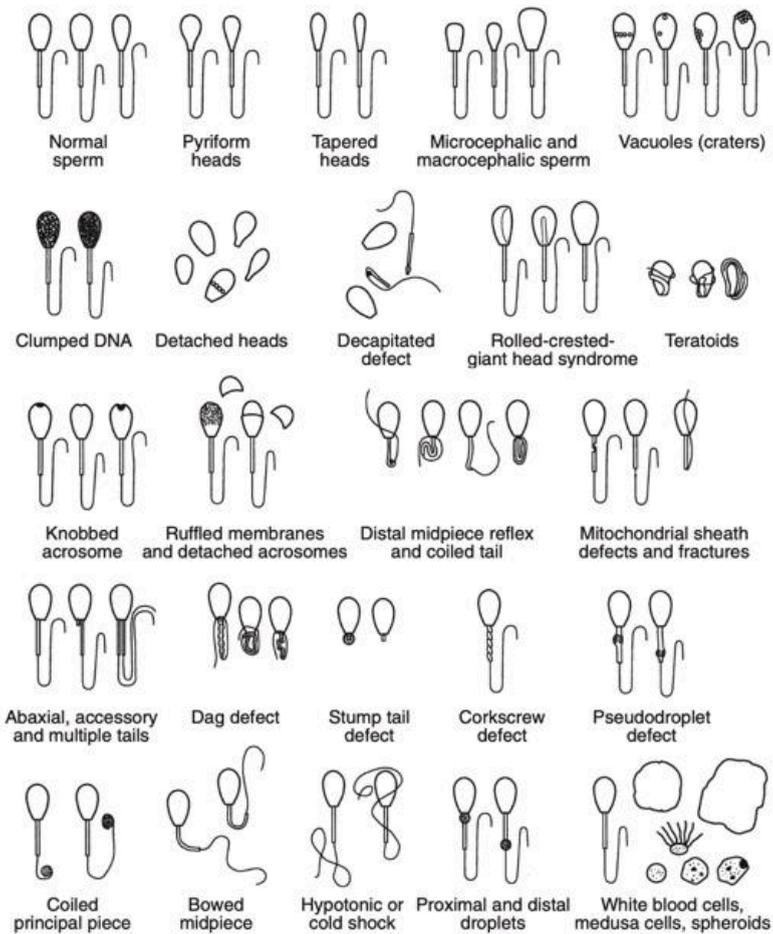


FIG 4-4 Principali difetti morfologici degli spermatozoi.

## 2. Obiettivi dello studio

L'obiettivo del seguente studio è di valutare il rapporto tra i diversi difetti spermatici e la loro variazione nel tempo. Più precisamente gli anni, i mesi e le stagioni sono stati suddivisi in quinquenni per mettere a confronto le variazioni delle anomalie o degli spermatozoi intatti in maniera più accurata. Per definire ciò, si è ricorsi ad uno studio bibliografico e analitico, riguardante le attività in centro genetico in merito alle analisi del seme in laboratorio, che hanno permesso di identificare, con buona precisione le differenti anomalie riscontrate negli animali in esame.

## 3. Materiali

Lo studio è stato effettuato nel periodo compreso tra aprile e luglio 2024, presso il Centro genetico "ANARB" (Associazione Nazionale Allevatori Razza Bruna) di Bussolengo (VR).

### 3.1 Soggetti in analisi

Gli animali presi in esame per questo studio sono tori di razza Bruna Italiana, tutti in possesso di informazioni anagrafiche e dei requisiti produttivi e morfologici che ne consentono la regolare iscrizione al Libro Genealogico. Tutti i tori vengono stabulati e alimentati nello stesso modo, e in buono stato di salute.

I dati analizzati comprendono 2449 campioni di seme raccolti in un periodo tra marzo 2002 e aprile 2024. Un altro fattore da considerare è la presenza di torelli in performance test, in quanto le caratteristiche del materiale seminale variano progressivamente durante l'addestramento.

### 3.2 Creazione del database

Una volta estrapolati dal sistema ANDROVISION® tutti i dati riguardanti le valutazioni morfologiche, si è proceduto all'aggregazione dei dati in maniera idonea su Microsoft Excel per effettuare le analisi successive.

I vari prelievi di seme sono stati suddivisi per mese, stagione e anno; una valutazione secondo un sistema gerarchico. Sul file Excel sono stati riportati i dati di ogni singolo campione: gocce citoplasmatiche, difetti della testa, difetti della coda, difetti della porzione centrale. Per ultimi gli spermatozoi intatti e il totale.

Le stagioni sono state suddivise in maniera pratica in: inverno (1), primavera (2), estate (3) e autunno (4). Anche i mesi sono suddivisi per numero: da gennaio (1) a dicembre (12), non prendendo in considerazione solstizi ed equinozi.

Si è calcolata la media di ogni mese; e di ogni stagione per ogni difetto. Successivamente si è calcolata la deviazione standard di ogni mese, per ogni difetto. I prelievi di seme sono 2449 perché selezionati in base ad una motilità inferiore all'80%, in quanto si è voluto analizzare i campioni con una motilità bassa rispetto alla media per analizzare eventuali difetti spermatici.

Il centro genetico ha adottato questa soglia per mantenere alta la qualità seminale.

#### 4. Metodi

Il metodo adottato per definire ogni singolo difetto è stata l'osservazione diretta della morfologia conoscendo le dimensioni reali normali della testa, della porzione intermedia e della coda di spermatozoo bovino. Non definito dai parametri CASA.

Per le gocce citoplasmatiche si sono prese in considerazione: le gocce prossimali presso la testa e le gocce distali presso la porzione intermedia o la coda.

Per i difetti della testa si sono presi in considerazione: la testa piriforme che presenta la forma "a pera", la testa microcefalica che presenta dimensioni ridotte rispetto alla testa normale, la testa macrocefalica che presenta dimensioni ingrandite rispetto alla testa normale e la testa staccata.

Per i difetti della coda si sono presi in considerazione: la coda arrotolata e la coda piegata.

Per i difetti della porzione intermedia si è presa in considerazione la DMR (riflesso del tratto intermedio distale) che presenta una curvatura a forma di "J".

I dati dal database del centro genetico, 2449 analisi morfologiche, hanno mostrato il rapporto tra le diverse anomalie e come varia la percentuale nel tempo, nell'arco di 22 anni.

Si è preso in considerazione l'intero numero di cellule valutate, le percentuali sono state quelle che hanno considerato le cellule intatte e la percentuale dei difetti riscontrati che sono: gocce citoplasmatiche, difetti della testa, difetti della coda e difetti della porzione intermedia.

## 5. Analisi

Sono stati messi a confronto le variazioni tra i cinque periodi relativi alle percentuali pure, alle deviazioni standard e alla media per valutare la distribuzione della variabilità di una popolazione. Il toro può essere valutato in base a quante volte il suo valore si differenzia dalla media.

La deviazione standard varia se il tempo viene diviso, per questo si è scelta la divisione in quinquenni.

Per fare l'analisi dei dati si è utilizzata la tabella pivot per organizzare e raggruppare i dati della tabella sorgente, è stata scelta per evidenziare in maniera chiara le variazioni tra i difetti e aggregare i dati. Misura della deviazione standard e della media (indici di variabilità).

Per mostrare quello che si è trovato analizzando i dati dei difetti spermatici si è ricorso all'uso di tabelle, le quali comprimono i dati e ne agevolano la comprensione. Il grafico a torta è utile per l'osservazione delle medie totali assolute dei singoli difetti spermatici rispetto al totale.

## 6. Risultati e discussione

La deviazione standard della media ci mostra quanto differisce dalla media ogni periodo (Tabella 6.3 e Tabella 6.4). Nella prima tabella vengono riportati i dati (media  $\pm$  deviazione standard) relativi ai difetti spermatici classificati: gocce citoplasmatiche, difetti della testa, difetti della coda e porzione intermedia (Tabella 6.1).

Per il numero totale di cellule prese in considerazione, il 49,63% della media delle cellule intatte sono state escluse. Si considerano solo le percentuali di difetti riscontrati.

Si nota una media di 30,16% dei difetti della testa nel mese di agosto, sta a significare che in quel mese o nel mese prima c'è stato un aumento delle temperature e la spermatogenesi è stata influenzata dal caldo, il quale va ad aumentare i difetti della testa.

Si nota una media di 5,60% di gocce citoplasmatiche, 4,27% di difetti della coda e 19,71% di difetti della porzione intermedia nei mesi di gennaio e febbraio. Stanno a significare che in quel mese o nel mese prima c'è stata una diminuzione delle temperature e la spermatogenesi è stata influenzata dal freddo, il quale va ad aumentare i difetti che hanno origine nell'epididimo (Tabella 6.2)

Le variazioni ci sono ma non sono significative, quindi con molta probabilità sono legate all'individuo preso singolarmente. La deviazione standard elevata indica la presenza di un'elevata variabilità, ma legata al singolo. Non c'è una reale differenza significativa tra le stagioni. Esiste, ma l'influenza della stagione è significativa solo sul singolo toro (Tabella 6.5).

Nei quinquenni si sono riscontrati valori medi assoluti che hanno evidenziato una media generale rispettivamente di 7,85% per i difetti delle gocce, 51,79% per i difetti della testa, 7,67% per i difetti della coda e 32,79% per i difetti della porzione intermedia (Grafico 6.1).

Valori (media  $\pm$  deviazione standard in %) dei difetti spermatici suddivisi per quinquennio.

| <b>Quinquennio</b> | <b>Gocce citoplasmatiche</b> | <b>Difetti della testa</b> | <b>Difetti della coda</b> | <b>Difetti della porzione intermedia</b> |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| 2002-2006          | 9,60 $\pm$ 10,99             | 52,90 $\pm$ 16,51          | 2,40 $\pm$ 4,00           | 35,10 $\pm$ 15,23                        |
| 2007-2011          | 10,19 $\pm$ 11,56            | 55,58 $\pm$ 17,15          | 1,88 $\pm$ 2,96           | 32,35 $\pm$ 15,98                        |
| 2012-2016          | 8,18 $\pm$ 10,75             | 57,74 $\pm$ 20,03          | 4,37 $\pm$ 13,83          | 29,71 $\pm$ 14,59                        |
| 2017-2021          | 2,91 $\pm$ 11,75             | 43,56 $\pm$ 19,12          | 18,56 $\pm$ 21,21         | 34,98 $\pm$ 19,30                        |
| 2022-2024          | 5,78 $\pm$ 8,76              | 47,68 $\pm$ 15,34          | 24,28 $\pm$ 15,40         | 22,25 $\pm$ 11,59                        |

Tabella 6.1 Nella tabella vengono presentate le medie dei difetti considerati negli anni 2002-2024 suddivisi per 5 quinquenni e 4 sezioni di difetti. Le medie sono messe a confronto con le rispettive deviazioni standard di ogni singolo difetto per valutare il rapporto con gli altri difetti e come variano nel tempo.

Nei quinquenni relativi alle gocce citoplasmatiche, ai difetti della testa e ai difetti della porzione intermedia, si nota come diminuiscono progressivamente le medie: da 9,60% a 5,78% per le gocce citoplasmatiche, da 52,90% a 47,68% per i difetti della testa e da 35,10% a 22,25% per i difetti della porzione intermedia. Potrebbero essere indicatori della progressiva crescita e quindi con il completamento dello sviluppo e della maturità sessuale gli animali migliorano la loro qualità e produzione seminale.

Al contrario nei quinquenni relativi ai difetti della coda si nota un aumento significativo della media: da 2,40% a 24,28%. Quindi legati a una maturazione alterata dell'epididimo, e/o a una prolungata ritenzione degli spermatozoi nel tratto genitale e/o a una composizione anomala del plasma seminale introdotto durante l'ejaculazione.

Valori (media e deviazione standard in %) dei difetti spermatici suddivisi per mese.

| Mese      | Gocce citoplasmatiche |        | Difetti della testa |        | Difetti della coda |        | Difetti della porzione centrale |        |
|-----------|-----------------------|--------|---------------------|--------|--------------------|--------|---------------------------------|--------|
|           | Media                 | Devst. | Media               | Devst. | Media              | Devst. | Media                           | Devst. |
| Gennaio   | 3,50                  | 6,93   | 27,27               | 16,27  | 4,27               | 7,09   | 14,98                           | 9,42   |
| Febbraio  | 5,60                  | 9,44   | 27,83               | 13,82  | 1,52               | 3,35   | 19,71                           | 12,79  |
| Marzo     | 4,11                  | 6,86   | 26,64               | 14,01  | 2,56               | 4,33   | 16,09                           | 9,48   |
| Aprile    | 3,38                  | 5,73   | 27,63               | 14,48  | 1,94               | 3,33   | 16,18                           | 8,72   |
| Maggio    | 4,66                  | 8,60   | 27,86               | 17,71  | 2,36               | 4,51   | 15,34                           | 9,89   |
| Giugno    | 3,98                  | 6,52   | 25,38               | 14,72  | 2,52               | 4,49   | 14,57                           | 8,82   |
| Luglio    | 3,85                  | 5,99   | 28,56               | 15,15  | 2,08               | 3,92   | 15,48                           | 10,15  |
| Agosto    | 5,05                  | 7,86   | 30,16               | 15,93  | 2,25               | 4,60   | 16,19                           | 10,19  |
| Settembre | 4,71                  | 6,39   | 27,23               | 13,28  | 3,15               | 5,23   | 16,46                           | 11,47  |
| Ottobre   | 4,72                  | 6,52   | 24,48               | 14,37  | 4,16               | 7,23   | 15,47                           | 10,58  |
| Novembre  | 4,13                  | 6,96   | 25,68               | 14,09  | 3,87               | 6,91   | 16,83                           | 10,59  |
| Dicembre  | 5,41                  | 8,66   | 24,17               | 14,30  | 2,79               | 5,25   | 17,31                           | 12,21  |

Tabella 6.2 Nella tabella vengono riportate la media e la deviazione standard di ogni difetto per ogni mese da gennaio a dicembre.

É interessante notare come varino la media e la deviazione standard nei diversi mesi. Nei mesi più caldi è considerevole l'aumento dei difetti della testa con picchi di 28,56% e 30,16% nei mesi di luglio e agosto. Nei mesi più freddi c'è un leggero aumento dei difetti della coda e della porzione intermedia con rispettivamente il 4,27% e il 19,71%. Per le gocce citoplasmatiche si vedono sostanziali aumenti nel mese di febbraio con il 5,60% e nel mese di agosto 5,05%, mesi più critici per temperature rigide e temperature elevate.

Valori (media del numero di deviazioni standard) dei difetti spermatici suddivisi per mese.

| <b>Mese</b> | <b>Gocce citoplasmatiche</b> | <b>Difetti della testa</b> | <b>Difetti della coda</b> | <b>Difetti della porzione intermedia</b> |
|-------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| Gennaio     | -0,13                        | 0,03                       | 0,28                      | -0,12                                    |
| Febbraio    | 0,16                         | 0,07                       | -0,24                     | 0,32                                     |
| Marzo       | -0,05                        | -0,01                      | -0,05                     | -0,02                                    |
| Aprile      | -0,15                        | 0,05                       | -0,17                     | -0,01                                    |
| Maggio      | 0,03                         | 0,07                       | -0,09                     | -0,09                                    |
| Giugno      | -0,06                        | -0,10                      | -0,05                     | -0,16                                    |
| Luglio      | -0,08                        | 0,12                       | -0,14                     | -0,08                                    |
| Agosto      | 0,08                         | 0,23                       | -0,11                     | -0,01                                    |
| Settembre   | 0,04                         | 0,03                       | 0,06                      | 0,02                                     |
| Ottobre     | 0,04                         | -0,16                      | 0,25                      | -0,08                                    |
| Novembre    | -0,04                        | -0,08                      | 0,20                      | 0,05                                     |
| Dicembre    | 0,13                         | -0,18                      | 0,00                      | 0,10                                     |

Tabella 6.3 Nella tabella vengono riportati i valori, suddivisi per mese (gennaio-dicembre), del numero di deviazioni standard che differiscono dalla media. La deviazione standard della media ci mostra quanto differisce dalla media ogni mese. Si può notare come i valori negativi siano maggiormente presenti nei mesi più caldi (da aprile ad agosto), ma pure nei mesi più freddi (da novembre a marzo). Questo rivela come la stagionalità possa influire sul rapporto dei diversi difetti nei mesi invernali, primaverili, estivi e autunnali.

Valori (media del numero di deviazioni standard) dei difetti spermatici suddivisi per quinquennio.

| <b>Quinquennio</b> | <b>Gocce citoplasmatiche</b> | <b>Difetti della testa</b> | <b>Difetti della coda</b> | <b>Difetti della porzione intermedia</b> |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|--|
| 2002-2006          | 0,18                         | 0,20                       | -0,30                     | 0,30                                     |
| 2007-2011          | 0,26                         | 0,38                       | -0,36                     | 0,23                                     |
| 2012-2016          | 0,01                         | 0,28                       | -0,26                     | -0,07                                    |
| 2017-2021          | -0,49                        | -0,73                      | 0,60                      | -0,44                                    |
| 2022-2024          | -0,29                        | -0,54                      | 1,23                      | -0,71                                    |

Tabella 6.4 Nella tabella vengono riportati i valori, suddivisi per quinquennio (2002-2024), del numero di deviazioni standard che differiscono dalla media. La deviazione standard della media ci mostra quanto differisce dalla media ogni periodo. Si può notare come il raggruppamento in quinquenni vada a mostrare l'abbassamento delle media delle deviazioni standard, portandole anche in negativo. Si nota per le gocce citoplasmatiche, i difetti della testa e i difetti della porzione intermedia. Al contrario per i difetti della coda i quali passano da valori negativi e valori positivi (da -0,30 a 1,23).

Valori (media, massimo, minimo in %) dei difetti spermatici suddivisi per mese

|           | <b>Gocce<br/>citoplasmatiche</b> | Max   | Min   | <b>Difetti della<br/>testa</b> | Max   | Min   | <b>Difetti della<br/>coda</b> | Max   | Min   | <b>Difetti della porzione<br/>centrale</b> | Max   | Min  |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|--------------------------------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|--|-------|------|
| Gennaio   | 3,50                             | 10,43 | -3,43 | 27,27                          | 43,54 | 10,99 | 4,27                          | 11,35 | -2,82 | 14,98                                      | 24,40 | 5,55 |
| Febbraio  | 5,60                             | 15,04 | -3,84 | 27,83                          | 41,65 | 14,01 | 1,52                          | 4,87  | -1,84 | 19,71                                      | 32,50 | 6,92 |
| Marzo     | 4,11                             | 10,97 | -2,75 | 24,17                          | 40,64 | 12,63 | 2,79                          | 6,89  | -1,76 | 17,31                                      | 25,57 | 6,62 |
| Aprile    | 3,38                             | 9,11  | -2,35 | 26,64                          | 42,11 | 13,14 | 2,56                          | 5,27  | -1,40 | 16,09                                      | 24,90 | 7,46 |
| Maggio    | 4,66                             | 13,26 | -3,94 | 27,63                          | 45,56 | 10,15 | 1,94                          | 6,86  | -2,15 | 16,18                                      | 25,23 | 5,45 |
| Giugno    | 3,98                             | 10,50 | -2,54 | 27,86                          | 40,11 | 10,66 | 2,36                          | 7,01  | -1,97 | 15,34                                      | 23,38 | 5,75 |
| Luglio    | 3,85                             | 9,84  | -2,14 | 25,38                          | 43,70 | 13,41 | 2,52                          | 6,00  | -1,84 | 14,57                                      | 25,63 | 5,34 |
| Agosto    | 5,05                             | 12,92 | -2,81 | 28,56                          | 46,10 | 14,23 | 2,08                          | 6,84  | -2,35 | 15,48                                      | 26,39 | 6,00 |
| Settembre | 4,71                             | 11,10 | -1,68 | 30,16                          | 40,50 | 13,95 | 2,25                          | 8,38  | -2,08 | 16,19                                      | 27,93 | 4,99 |
| Ottobre   | 4,72                             | 11,24 | -1,80 | 27,23                          | 38,85 | 10,11 | 3,15                          | 11,38 | -3,07 | 16,46                                      | 26,04 | 4,89 |
| Novembre  | 4,13                             | 11,09 | -2,84 | 24,48                          | 39,77 | 11,59 | 4,16                          | 10,79 | -3,04 | 15,47                                      | 27,43 | 6,24 |
| Dicembre  | 5,41                             | 14,08 | -3,25 | 25,68                          | 38,46 | 9,87  | 3,87                          | 8,03  | -2,46 | 16,83                                      | 29,53 | 5,10 |

Tabella 6.5 La tabella mostra le fluttuazioni della media nei diversi mesi da gennaio a dicembre. Per ogni media vi sono correlati i valori minimi e massimi, utili a comprendere il grado di significabilità di questi dati.

Non è presente un legame interessante con i dati delle componenti delle anomalie seminali quando queste ultime sono considerate singolarmente. Si evidenzia invece una più stretta relazione sulle voci totali (gocce citoplasmatiche, difetti della testa, difetti della coda e difetti della porzione intermedia) nelle quali ogni singola componente interagisce con le altre e quindi si hanno risultati più visibili. Le correlazioni significative hanno valori bassi, quindi i rapporti che legano i vari dati non sono così forti se considerati sulla totalità.

In ogni caso sono utili per ipotizzare che i mesi più caldi, luglio e agosto, vanno ad influire sul seme decrementando la qualità, perché aumentano le anomalie.

Valore della media totale assoluta (%) riferita ai quattro gruppi di difetti spermatici.

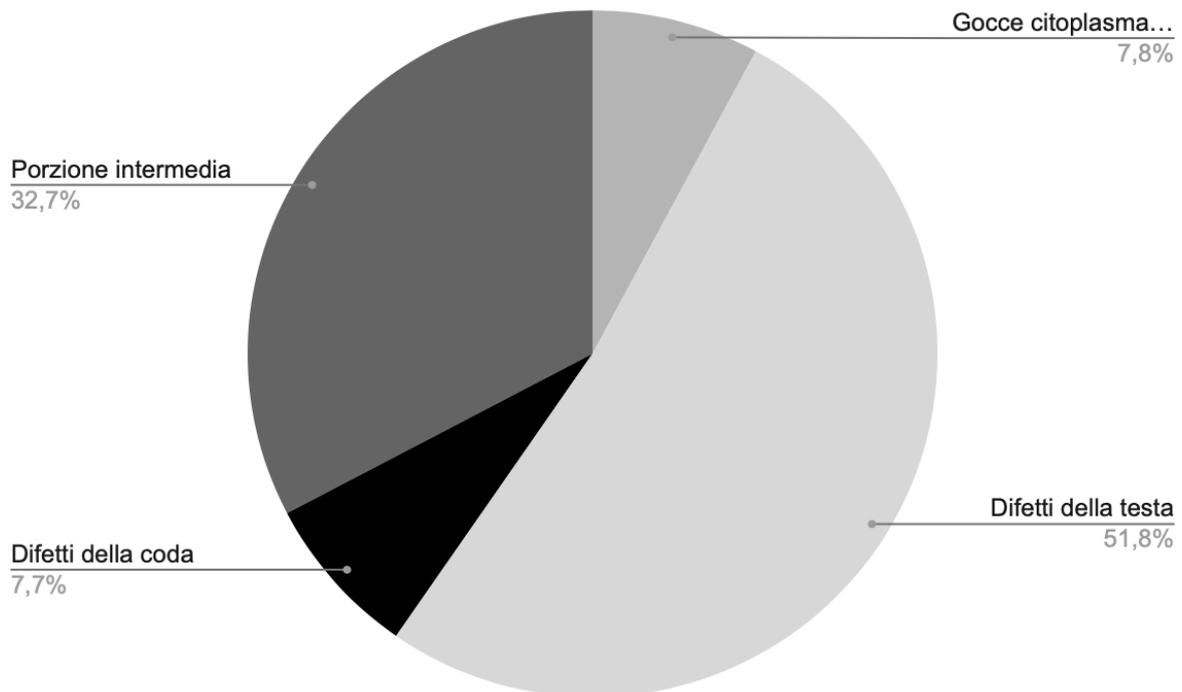


Grafico 6.1 Nel grafico viene diviso il totale generale delle medie dei difetti spermatici nelle diverse parti. Ogni fetta del grafico rappresenta l'incidenza del difetto sul totale dei difetti considerati. L'area più estesa, di colore grigio chiaro, mostra la percentuale dei difetti della testa (51,8%), che risultano essere incisivi sul totale di tutte le anomalie riscontrate in questo studio.

Nell'altra metà del grafico si presentano i difetti secondari, i quali hanno incidenza minore rispetto al totale: rispettivamente 32,7% per la porzione intermedia, 7,8% per le gocce citoplasmatiche e 7,7% per i difetti della coda.

## 7. Conclusione

La produzione di sperma è determinante nella capacità riproduttiva di un singolo toro maschio. Sebbene la libido sia molto importante con i sistemi di accoppiamento naturali, il numero di potenziali accoppiamenti di un toro utilizzato per l'inseminazione artificiale è generalmente limitato dal numero di spermatozoi normali prodotti per unità di tempo. È quindi importante riconoscere i fattori che hanno impatto o non hanno impatto sulla produzione di sperma. Vediamo come per la maggior parte delle specie, le dimensioni testicolari e la produzione di sperma aumentano a livelli massimi per un periodo di tempo dopo la pubertà, e poi rimangono a quel livello fino a quando alla fine diminuiscono a causa della senescenza. Questo modello è caratteristico per il toro. Pertanto, i giovani maschi hanno testicoli che sono più piccoli e meno produttivi rispetto a quelli di individui sessualmente più maturi.

L'impatto della stagione sulla produzione di sperma dipende dalla gestione dell'allevamento. Un centro genetico mette in atto misure che garantiscono la disponibilità di cibo, la protezione dal maltempo, le cure sanitarie ecc., e questo, nel tempo, ha presumibilmente diminuito i difetti spermatici legati alla stagione in queste specie addomesticate. Il toro produce sperma ad un ritmo costante durante tutto l'anno, per questo i cambiamenti stagionali nella produzione di sperma sono tipicamente associati a brusche variazioni meteorologiche legate alle mezze stagioni. La normale spermatogenesi richiede una temperatura testicolare leggermente al di sotto della normale temperatura corporea. È per questo che i testicoli risiedono all'interno dello scroto. È importante quindi saper riconoscere il potenziale del danno causato dalle temperature elevate, perché l'effetto rifletterà sulla fertilità e la qualità seminale.

L'esito di questo studio dimostra che i difetti riscontrati sono maggiormente legati alla stagionalità, rispetto all'età o all'ambiente in cui stabulano i tori.

C'è da aggiungere che negli ultimi anni vi è un'incidenza dei cambiamenti climatici che potrebbe portare ad una transizione verso nuovi sistemi di allevamento che non

risulta semplice. Ciò comprende l'innalzamento della temperatura e l'aumento in frequenza ed intensità degli eventi climatici estremi che danneggiano le produzioni agricole, compromettono lo stato di salute degli animali allevati e contribuiscono alla perdita di biodiversità vegetale e animale

Per quanto riguarda le analisi sviluppate si può affermare che non vi sono differenze significative che possano influenzare la produzione e la qualità dello sperma; diviene significativa se legata ad ogni singolo soggetto, come si è visto nell'ultima tabella.

Quello che si è notato negli anni 2002-2024 è che si ha un minimo e un massimo di difetti spermatici e sono classificabili con un minimo e massimo per stagione, e che non è variato in maniera significativa in questo periodo di tempo.

Risulta un'informazione importante per la genetica di questa razza perché su 22 anni di studi morfologici viene riscontrata la percentuale più alta, quella dei difetti della testa.

In base ai risultati delle analisi si può distinguere la gravità dei difetti: il primo difetto maggiormente riscontrato è legato alle anomalie della testa, il secondo difetto è legato alle anomalie della porzione centrale, il terzo difetto è legato alle gocce citoplasmatiche e all'ultimo posto le anomalie della coda.

Si è riscontrato che non vi è variazione del rapporto tra i difetti.

Abbiamo usato un metodo di monitoraggio che è stato già applicato nel suino nella gestione della scrofaia (Youngquist, 2006) che concettualmente è applicabile anche al toro. L'approccio statistico della deviazione standard diventa molto utile per il monitoraggio e per la gestione dei dati in un centro tori o in un allevamento.

## 8. Bibliografia

1. Aguggini G. Et al. 2000. Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia. 769-777.
2. AA.VV. Autori vari. Collana Summa: animali da reddito. 2020. La gestione riproduttiva del bovino. Test di laboratorio per valutare la capacità riproduttiva del toro. *Le Point Vétérinaire Italie*. 95-106.
3. Bortolami R. Beghelli V. Et al. 2009. Anatomia e fisiologia degli animali domestici. Bologna: Edagricole - Edizioni Agricole della Calderini s.r.l.(8):319-332.
4. Barth, A.D. Oko, R.J. 1989. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press.
5. Bigi D. Zanon A. Et. al. 2020. Atlante delle razze autoctone. Bovini, equini, ovicaprini, suini allevati in Italia. Bologna: Edagricole - Edizioni Agricole della Calderini s.r.l. 9-10.
6. Balasini D. 2000. *Zootecnia applicata: Bovini e Bufali*. Bologna: Edagricole - Edizioni Agricole della Calderini s.r.l.
7. Bremer J. Heringstad B. Et al. 2023. Novel interpretation of sperm stress test and morphology for maturity assessment of young Norwegian Red bulls. *Animal reproduction* 1-16.
8. Blom E. Birch-Andersen A. 1969. Ultrastructure of the decapitated sperm defect in Guernsey bull. *J. Reprod. Fert* (23): 67-72.
9. Brito, L. Et al. 2002. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Animal Reprod. Sci.* (70): 181–190.
10. Banaszewska D. Andraszek K. 2015. The effect of selected staining techniques on bull sperm morphometry. *Animal Reproduction Science* (159): 17-24.
11. Chenoweth PJ. 1994. Bull behavior, sex drive and management. *Topics in bull fertility*. IVIS. 1-13

12. Chenoweth PJ. Hopkins FM. 1993. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation. *Theriogenology* (10): 7-93.
13. Chenoweth PJ. Lorton S. 2014. Animal andrology theories and application. *Sperm Production and its Harvest*. CABI (2): 26-34
14. Curto F. 2008. Gestione delle tare genetiche nelle popolazioni bovine in selezione: l'esperienza della razza Bruna Italiana. Relatore Summer A. Correlatore Rossoni A. Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Qualità e Sicurezza degli Alimenti. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli studi di Parma, Parma.
15. Enciso M. Cisale H. Et al. 2011. Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology* (76): 23-32.
16. Fernandez-Novo A. Santos-Lopez S. 2021. Effects of Extender Type, Storage Time, and Temperature on Bull Semen Parameters. *MDPI* 1-17.
17. Farrell P. Presicce G. Et al. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology* (49): 871–879.
18. Freshman, J.L. 2002. Semen collection and evaluation. *Clin. Tech. Small Anim. Pract.* (17)104.
19. Hafez, E.S.E. 2011. Riproduzione e inseminazione artificiale negli animali. Riproduzione negli animali da allevamento. *Libreriauniversitaria.it* 26.
20. H. Koziol. C.L. Armstrong. 2022. USA: Blackwell Pub. Sperm morphology of domestic animals. Cap: Head abnormalities. 11-47.
21. J.H. Koziol. C.L. Armstrong. 2022. USA: Blackwell Pub. Sperm morphology of domestic animals. Cap: Midpiece abnormalities. 49-82.
22. J.H. Koziol. C.L. Armstrong 2022. USA: Blackwell Pub. Sperm morphology of domestic animals. Cap: Tail (Principal Piece) abnormalities. 85-99.
23. Johnson K.R. Dewey C.E. Et al. 1998. Prevalence of morphologic defects in spermatozoa from beef bulls. *J Am Vet Med Assoc.* (213): 1468-1471.
24. J. L. Hancock. 1951. The Morphology of Bull Spermatozoa. *J Exp Biol* (3): 445–453.

25. Johnson, W. H. 1997. The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* (13):255–270.
26. Kastelic J.P. Thundathil J.C. 2008. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reprod Domest Anim* (43): 368-373.
27. Koonjaenak S. Chanatinart V. Et al. 2007. Seasonal variation in semen quality of swamp buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) in Thailand. *Androl.* (9):92–101.
28. Mathevon M. Buhr M. Et al. 1998. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Dairy Sci.* (81): 3321–3330.
29. Malmgren L. 1997. Assessing the quality of raw semen: A review. *Theriogenology* (48): 523–530.
30. Menon A. Barkema H. 2011 Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research* (4): 241–247.
31. Menon A. Thundathil J. 2011. Validating the assessment of bull sperm morphology by veterinary practitioners. *Canadian Veterinary Journal* (4): 407–408.
32. Nongbua T. Et al. 2020. Effects of season and single layer centrifugation on bull sperm quality in Thailand. *Asian-Aust. J. Animal Sci.* (33): 1411.
33. Netherton J. Robinson B. 2022. Seasonal variation in bull semen quality demonstrates there are heat-sensitive and heat-tolerant bulls. *Scientific reports* (12): 15322.
34. Ostermeier G.C. Androl J. Et al. 2001. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *PMID* (4): 595-603.
35. Page R. Lester T. Et al. 2019. Ergot Alkaloid Effects on Bovine Sperm Motility In Vitro. *Advances in Reproductive Sciences* (7): 7-15.
36. Quintero-Moreno A. Ramirez M.L. Et al. 2015. Comparison of two histologic stains in the evaluation of sperm head morphometric measurements in frozen-thawed bull semen. *Acta Microscopica* (24): 103-110.

37. Robbiati G. Maienza A. 2023. Allevamento e cambiamenti climatici. Mitigazione dei cambiamenti climatici. Legnaro: Ed. Veneto Agricoltura (1): 8-15.
38. Saacke R. 1970. Morphology of the sperm and its relationship to fertility. Proc 3rd Tech Conf AI Reprod. 17-30.
39. Söderquist L. Janson L. Larsson K. Et al. 1991. Sperm morphology and fertility in AI bulls. Transbound Emerg Dis. (38): 534-543.
40. Smith M.F. Morris D.L. Et al. 1981. Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality, and libido in Santa Gertrudis bulls. Theriogenology (16): 379-397.
41. Saacke R. DeJarnette, J. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super-and single-ovulating cattle?. Theriogenology (50):117–128.
42. Söderquist L. Janson L. Et al. 1996. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy AI bulls. Anim. Reprod. Sci. (44): 91–98.
43. Testa L. 2003. Performance test nella razza bruna: aspetti riproduttivi. Relatore Bagnato A. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli studi di Milano, Lodi.
44. Toffanin E. 2015. Studio morfologico ed ottimizzazione dei parametri CASA in campioni di seme bovino, caprino, ovino e canino. Relatore Stelletta C. Correlatori Daskin A. Tekin K. Dipartimento di medicina animale, produzioni e salute. Facoltà di Medicina Veterinaria. Università degli studi di Padova, Legnaro.
45. Valeanu S. Johannisson A. 2015. Seasonal variation in sperm quality parameters in Swedish red dairy bulls used for artificial insemination. Livestock Sci. (173): 111–118.
46. V.E.A. Perry. 2021. The Role of Sperm Morphology Standards in the Laboratory Assessment of Bull Fertility in Australia. Frontiers of Veterinary Science (8): 672058.

47. Vencato J. Et. al. 2024. Comunicazione personale. Metodo di gestione del seme presso centro tori.
48. Youngquist R. Threlfall W. 2006. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Philadelphia: W B Saunders Co. Cap. 30: Clinical Reproductive Physiology and Endocrinology of Bulls. 221-227.
49. Youngquist R. Threlfall W. 2006. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Philadelphia: W B Saunders Co. Cap. 31: Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. 228-239.
50. Youngquist R. Threlfall W. 2006. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Philadelphia: W B Saunders Co. Cap. 34: Techniques for Artificial Insemination of Cattle with Frozen-Thawed Semen. 253-257.
51. Youngquist R. Threlfall W. 2006. Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Philadelphia: W B Saunders Co. Cap. 111: Using Statistical Process Control to Investigate Reproductive Failure in Swine. 821-826

## 9. Sitografia

1. Ass. Naz. Allevatori razza Bruna Italiana. 2024. Centro genetico. <http://www.anarb.it/>
2. Elsevier B.V. 2024. <https://www.sciencedirect.com/>
3. MINITÜB GMBH. 2024. Minitüb manual. <http://www.minitube.com/>
4. Michele Corti. 2008. La Bruna. <http://www.ruralpini.it/>
5. NCBI Literature Resources. 2024. <http://www.pubmed.com/>
6. Microsoft Excel. 2024. <http://microsoft.com/>

## 10. Ringraziamenti

Innanzitutto vorrei ringraziare il prof. Stelletta Calogero che mi ha dato supporto in questo studio e mi ha dato la possibilità di approfondire e incuriosirmi delle tecniche riproduttive.

Grazie al dott. Vencato (veterinario del centro genetico di Bussolengo). Senza la collaborazione con il centro non avrei realizzato questa tesi. Grazie per la pazienza e l'aiuto a raccogliere e organizzare i dati del centro tori.

Grazie a Claudia Recchia (tecnica di laboratorio del centro genetico di Bussolengo) che è stata un'ottima collega e mi ha insegnato come gestire le analisi in laboratorio. Oltre a questo mi è stata vicino nei momenti di dubbio o incomprensioni, come un'amica.

Grazie ai miei genitori, Paola e Patrizio, che mi hanno visto nei momenti peggiori, durante le varie sessioni e la stesura della tesi. Grazie della vostra pazienza e perdonatemi se sono stata immersa nell'ansia da esame.

Grazie a mia nonna, Luisa, sempre pronta a rendermi felice con i suoi piatti deliziosi e fatti con amore per me. Grazie dell'affetto e della complicità che abbiamo.

Grazie alle mie amiche di corso: Arianna, Elisa, Marta P., Marta Z., Francesca, Alice. Grazie per i momenti passati insieme durante le lezioni, per le risate, per le pause nel prato di Agripolis, per le crisi in sessione, per la passione per le vacche, per le gite negli allevamenti. Rimarranno dei ricordi indimenticabili. Sono contenta di avervi conosciuto e avervi avuto vicino nei momenti di sconforto. Siete nel mio cuore.

Grazie ai miei amici di volontariato: Martina, Angelo, Giacomo, Alessia, Federico, Marta e tanti altri. Che mi hanno aiutata a non chiudermi durante questi anni di studio, facendo qualcosa di buono per gli altri. Probabilmente non avrete ancora capito di cosa parlo in questa tesi, ma avete colto l'amore per gli animali che ho da sempre.

Grazie a Francesco, che mi ha fatto credere di più in me stessa e ha reso lo studio meno pesante. Grazie per le giornate in alpeggio e sotto le stelle. Sono felice di avervi avuto vicino.

Grazie a tutti coloro che mi hanno dato supporto!

