

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute
Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

**Valutazione dei parametri fisiologici e
dello stato ossidativo del seme di giovani
tori PRI in relazione alle variabili
ambientali**

Relatore: Prof. Elisa Giaretta

Correlatore: Prof. Gianfranco Gabai

Laureanda: Laura Sbalchiero

Matricola: 1236176

Anno accademico 2023 - 2024

Sommario

1. RIASSUNTO.....	4
2. PREFERAZIONE	6
3. SCOPO DELLA TESI.....	8
4. INTRODUZIONE	9
4.1. Liquido spermatico	9
4.1.1. Costituenti cellulari: gli spermatozoi.....	9
4.1.2. Plasma Seminale.....	12
4.2. Stress ossidativo: definizione e ruolo nella riproduzione del bovino.....	15
4.2.1. Markers dello status ossidativo del plasma seminale	18
4.3. Termoregolazione e stress da calore nel toro.....	20
4.3.1. Termoregolazione dell'apparato riproduttore nel toro.....	20
4.3.2. Stress da calore	21
4.3.3. THI ambientale	23
5. MATERIALI E METODI.....	24
5.1. Disegno sperimentale	24
5.2. Azienda, animali e campionamento.....	24
5.3. Schede Genealogiche.....	25
5.4. Dati relativi ai parametri ambientali.....	26
5.5. Valutazione dei parametri seminali.....	27
5.5.1. Valutazione dei parametri seminali in campo.....	27
5.5.2. Valutazione dei parametri seminali in laboratorio.....	30
5.6. Analisi dei dati	35
6. RISULTATI.....	36
6.1. Parametri fisiologici del seme e del plasma seminale	36

6.1.1. Statistica descrittiva.....	36
6.1.2. Relazioni tra i parametri del seme e del plasma seminale.....	38
6.2. Variabili ambientali e parametri seminali.....	43
6.2.1. Statistica descrittiva sulle variabili ambientali.....	43
6.2.2. Relazione tra parametri seminali e variabili ambientali.....	45
6.3. Risultati AOPP e Di-tirosina.....	58
6.3.1. Analisi spettrofotometrica della DT.....	58
6.3.2. Western Blotting.....	59
7. DISCUSSIONE.....	64
7.1. Relazione tra i parametri del seme e del plasma seminale.....	64
7.2. Effetti delle variabili ambientali sui parametri seminali.....	65
7.3. AOPP e Di-tirosina.....	67
8. CONCLUSIONE.....	69
RINGRAZIAMENTI.....	70
TABELLE ACRONIMI.....	71
BIBLIOGRAFIA.....	72

1. RIASSUNTO

L'obiettivo di questa tesi prevede lo studio delle caratteristiche del seme di tori Pezzata Rossa (n=120) e delle variazioni ambientali definite dal THI "Indice di Temperatura-Umidità". Sono stati analizzati i parametri qualitativi del seme (volume, concentrazione, morfologia, motilità) e gli indicatori di status ossidativo del plasma seminale (PS) in laboratorio. Gli animali sono stati allevati presso il centro genetico ANAPRI (Associazione Nazionale Allevatori Pezzata Rossa Italiana) con sede a Fiume Veneto (PN). Il seme è stato raccolto con vagina artificiale da 120 giovani tori di età compresa tra 363 e 419 giorni circa, nel periodo tra febbraio 2022 e settembre 2023. Dopo la raccolta sono stati valutati i principali parametri di qualità seminale: il volume, la concentrazione, la morfologia e la motilità, tenendo in particolare conto di tali misurazioni: motilità totale (total motility, TM, %), motilità progressiva (progressive motility, PM, %), velocità curvilinea (curvilinear motility, VCL, $\mu\text{m/s}$), velocità media (average path velocity, VAP, $\mu\text{m/s}$), velocità rettilinea (straight-line velocity, VSL, $\mu\text{m/s}$), rettilineità (straightness, STR, %), linearità (linearity, LIN, %), spostamento laterale della testa medio (average lateral head displacement, ALH, μm), spostamento laterale della testa massimo (maximum lateral head displacement, mALH, μm), frequenza (beat cross frequency, BCF, Hz) e oscillazione (wobble, WOB, %). Per la valutazione dello status ossidativo sono state svolte analisi sul plasma seminale in merito alla concentrazione di Advanced Oxidation Protein Products (AOPP), gruppi carbonili (CT) e tioli. Per l'analisi statistica sono state valutate le relazioni tra i diversi parametri fisiologici degli spermatozoi e del plasma seminale tramite modelli di regressione lineare, considerando come relazioni significative quelle aventi $p < 0.05$. Dai risultati si osserva che vi è una relazione positiva tra la concentrazione di AOPP (nmol/mL) del PS e la concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato, la TM e la PM, mentre all'aumentare della concentrazione di tioli del PS si osserva un aumento della concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato. Inoltre, è stato osservato all'aumentare della concentrazione di testosterone (TST) nel PS risulta un aumento significativo della percentuale di anomalie spermatiche minori e una riduzione della percentuale di spermatozoi normali e gli spermatozoi normali vivi. I parametri seminali sono stati posti in relazione con il THI ambientale delle 24h e dei 60 giorni precedenti al prelievo tramite l'utilizzo di modelli di regressione lineare. È stato osservato che all'aumentare del THI dei 60 giorni precedenti al prelievo, si ha un aumento delle

anomalie maggiori e delle anomalie minori. Inoltre, è stata osservata una relazione significativa tra l'aumento del THI dei 60 gg precedenti al prelievo e la TM, PM, LIN e la concentrazione di AOPP nel PS. All'aumento del THI delle 24h precedenti al prelievo si osserva una riduzione della percentuale di spermatozoi normali e della VCL, ciò nonostante, risulta un aumento della concentrazione di AOPP nel PS. Sia il THI dei 60 gg sia il THI delle 24h presentano relazioni positive con i parametri di motilità seminale e la concentrazione di AOPP nel PS, ma per quanto riguarda il THI dei 60 gg si nota una maggior influenza sulle anomalie maggiori e minori. Infine, sono state eseguite le analisi Western Blot sul plasma seminale di alcuni campioni, selezionati in base al diverso contenuto di AOPP nel plasma seminale, per valutare le concentrazioni di di-tirosina (DT), considerando le numerose relazioni delle AOPP con i diversi parametri seminali e ambientali. È stato osservato che la DT è maggiormente espressa a specifici pesi molecolari (11 kDa, 14,5 kDa, 36 kDa); l'intensità di fluorescenza della DT a questi pesi molecolari è stata messa in relazione con le AOPP, osservando una relazione tra AOPP e DT quando la concentrazione di AOPP è maggiore di 100 nmol/mL.

Si può quindi confermare che lo stress ossidativo correla con lo stress da calore, ma con l'aumento del THI si osservano un aumento della TM e della PM degli spermatozoi. Per questo si può affermare che l'influenza delle variabili ambientali sia in grado di agire su diversi aspetti della qualità seminale. Inoltre, le AOPP risultano rilevanti da approfondire perché influenzano diversi parametri seminali, tra cui la motilità, e potrebbero rappresentare un marker interessante di stress ossidativo soprattutto se indagate insieme alla DT.

2. PREFERAZIONE

Lo scopo dell'elaborato si colloca nell'ambito di un progetto più ampio denominato "Le razze bovine a duplice attitudine: un modello alternativo di zootecnia ecosostenibile – Dual Breeding fase 2". Si sottolinea che il progetto viene svolto in unione con ANAPRI (Associazione Nazionale Allevatori Pezzata Rossa Italiana) scegliendo le Pezzate Rosse come razza a duplice attitudine in esame.

Lo studio si articola in diverse fasi inter-correlate e possiamo individuare due linee principali:

Linea A: "Studio dei fattori ambientali e gestionali associati a disfunzioni comportamentali che pregiudicano il benessere animale riscontrabili nella fase giovanile di allevamento di bovini a duplice attitudine di razza Pezzata Rossa Italiana (PRI)".

Linea B: "Relazione tra il temperamento e l'efficienza alimentare e riproduttiva in giovani candidati riproduttori maschi allevati in stazione".

Questa parte dello studio è stata svolta presso il Centro Genetico di ANAPRI (Azienda Ricchieri di Fiume Veneto, PN), con lo scopo di studiare dal punto di vista comportamentale, di qualità seminale, di efficienza alimentare (Fontoura et al., 2016) e libido i giovani candidati riproduttori ed esaminare questi diversi parametri in relazione alle condizioni ambientali a cui sono sottoposti (variazioni di temperatura, umidità).

In parte lo studio è stato condotto autonomamente per quanto riguarda l'analisi delle registrazioni comportamentali, termografiche e di motilità seminale, e concluso nei laboratori del dipartimento BCA (Biomedicina Comparata e Alimentazione) dell'Università degli Studi di Padova.

Da questa linea sono emersi diversi argomenti di studio:

- a) Approfondimento del comportamento prima e dopo la monta artificiale in relazione ai parametri di qualità seminale;
- b) Correlazione tra la temperatura corporea dei tori valutata tramite analisi termografiche e il comportamento durante il prelievo del seme;
- c) Analisi dei parametri fisiologici e dello stato ossidativo del seme in relazione alle variabili ambientali;

- d) Approfondimento dello studio dei parametri di stress ossidativo del plasma seminale.

I punti finali c) e d) rappresentano l'oggetto dell'elaborato.

3. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo progetto di tesi è valutare la relazione tra le diverse componenti del seme e i markers di stress ossidativo del plasma seminale, considerando il ruolo dei fattori ambientali.

Diversi studi in letteratura indagano le conseguenze dello stress ossidativo nella riproduzione del toro con l'obiettivo di aumentare le conoscenze in merito alla fertilità. Per poter migliorare tali competenze è utile studiare la relazione tra i principali parametri di qualità seminale e la composizione del plasma seminale.

In questo caso si vuole approfondire l'argomento concentrandosi sui markers meno studiati in letteratura, come le Advanced Oxidation Protein Products (AOPP), cercando di definire la loro relazione con i parametri seminali.

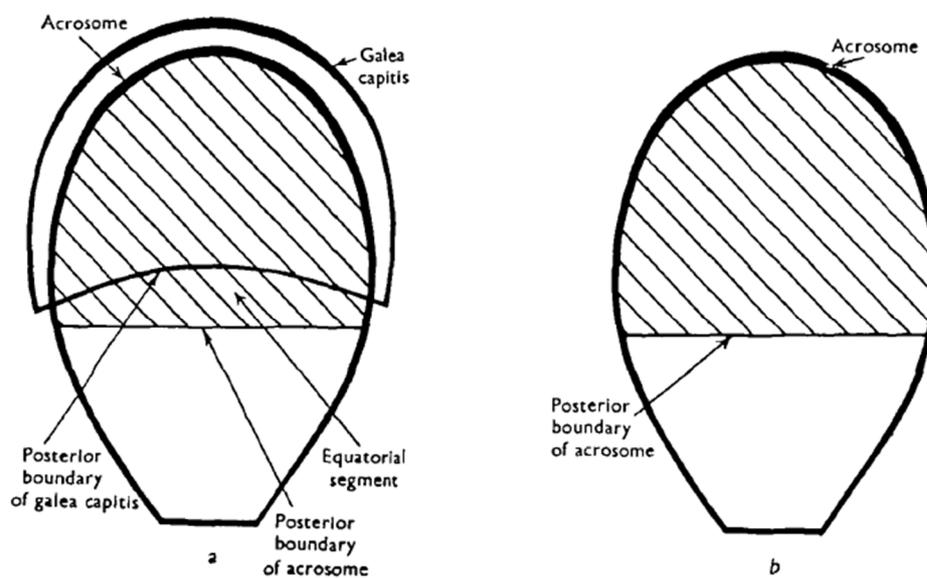
In secondo luogo, vengono analizzate le variabili ambientali e lo stress da calore, al fine di stabilire gli effetti sulle performance riproduttive e la relazione con lo stress ossidativo. L'obiettivo è avere maggior chiarezza sulle dinamiche che interferiscono con la qualità seminale, di modo da perfezionare la selezione genetica nell'ambito di una razza a duplice attitudine come la Pezzata Rossa per una realtà allevatoria sempre più sostenibile.

4. INTRODUZIONE

4.1. Liquido spermatico

4.1.1. Costituenti cellulari: gli spermatozoi

Gli spermatozoi sono cellule sessuali prodotte dai testicoli attraverso la spermatogenesi, un processo finemente regolato per permettere la moltiplicazione e la differenziazione dei gameti maschili (Staub & Johnson, 2018). Dal punto di vista morfologico gli spermatozoi presentano una testa e una coda: la testa è formata da un rivestimento esterno che ricopre la metà anteriore (figura 1) e un rivestimento più interno ovvero l'acrosoma. (Hancock, 1952). L'acrosoma ha un ruolo fondamentale nella fecondazione perché la sua reazione permette di superare la zona pellucida dell'oocita e legare la membrana, dopo che lo spermatozoo è stato iperattivato nell'apparato riproduttore femminile. (Patrat et al., 2000).



Text-fig. 1. *a.* Conventional diagram of head of bull spermatozoon.
b. Head of living spermatozoon (see text).

Figura 1. Parti che caratterizzano la testa dello spermatozoo (Hancock, 1952).

La testa contiene il nucleo con il materiale genetico aploide mentre il flagello che costituisce la coda è responsabile della motilità. In particolare il flagello è composto da due componenti: il collo, tra la testa e la coda, che ospita i mitocondri, i quali tramite la fosforilazione ossidativa producono l'energia per permettere la motilità. Infine, la parte intermedia e terminale del flagello che con il loro movimento consentono l'avanzamento del gamete (Malo et al., 2006).

Per quanto riguarda il metabolismo degli spermatozoi prendiamo in esame l'articolo di Storey (2008) sul metabolismo spermatico dei mammiferi. In questo studio si afferma che gli spermatozoi bovini utilizzano l'ossigeno (O_2) per produrre energia e di conseguenza per muoversi anche in assenza di plasma seminale. In condizioni di anaerobiosi, utilizzano il glucosio o altri zuccheri fermentescibili per ottenere acido lattico quindi sviluppano sia un metabolismo ossidativo, sia un metabolismo glicolitico. Anche nello studio sull'attività mitocondriale di Blanco-Prieto et al. (2023) si analizza il ruolo dei diversi complessi della catena di trasporto degli elettroni situati nei mitocondri, soprattutto del complesso III, e viene sottolineato che, in base all'ambiente e allo stato del seme (per esempio post-congelamento) il gamete bovino è in grado di utilizzare anche la glicolisi.

La fosforilazione rimane più efficiente come meccanismo, di conseguenza i mitocondri assumono un ruolo particolarmente importante nella produzione di energia, non solo per la motilità del flagello ma anche per svolgere altri eventi come la capacitazione. Nonostante ciò, tale attività metabolica induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Blanco-Prieto et al., 2023). Le più comuni sono: l'anione superossido (O_2^-) come molecola primaria, in seguito l'ossigeno singoletto (O_2), il perossido d'idrogeno o acqua ossigenata (H_2O_2), il radicale perossilico (ROO^-), i radicali idrossilici (OH^-) (O'Flaherty & Matsushita-Fournier, 2017). La loro produzione aumenta lo stress ossidativo che ha una duplice funzione, in parte fisiologica di mantenere attivi i meccanismi antiossidanti funzionali per proteggere la cellula permettendo allo spermatozoo la sua maturazione, iperattivazione e reazione acrosomiale (Barati et al., 2020). D'altra parte, un eccesso di ROS induce conseguenze che possono portare alla morte cellulare (figura 2).

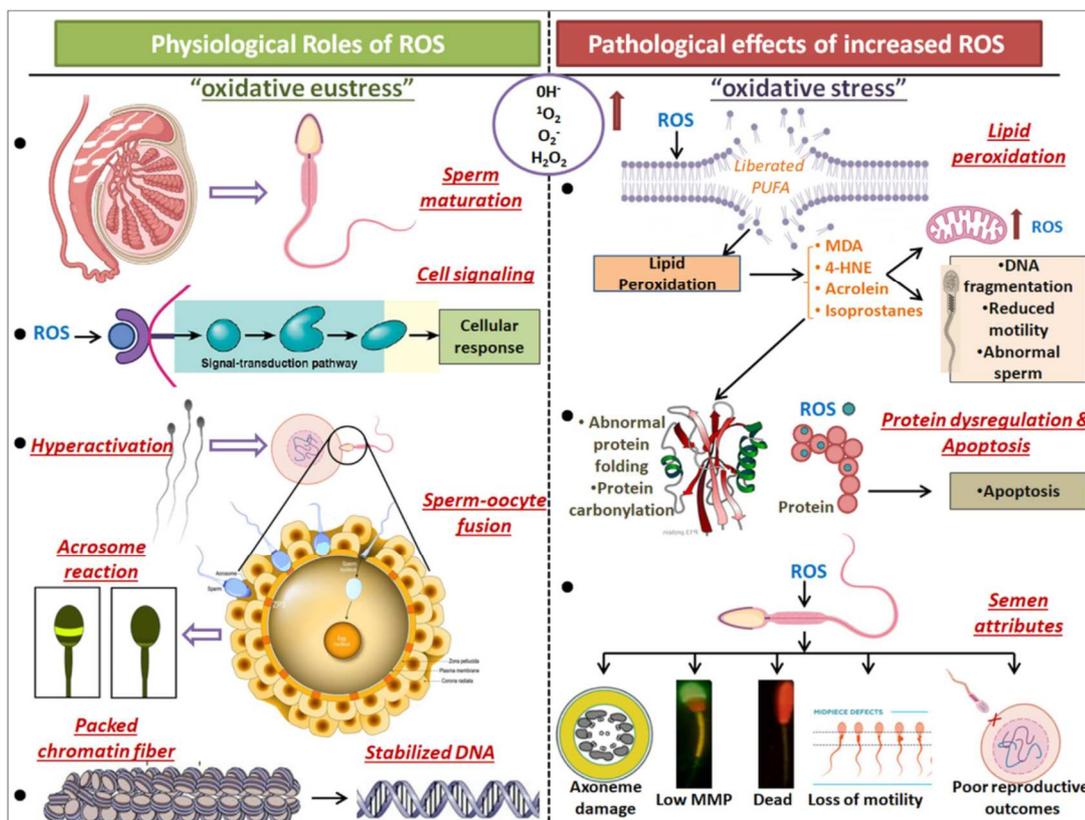


Figura 2. Riassunto delle conseguenze fisiologiche e patologiche indotte dai ROS. In ambito fisiologico l'eustress ossidativo permette la maturazione spermatica, l'innescò del segnale tra cellule e la loro attività (influenzano i canali ionici, modulano le chinasi e regolano in questo modo le risposte cellulari). Altre funzioni regolate dai ROS sono: l'iperattivazione spermatica con conseguenze reazione acrosomiale, la fusione tra oocita e spermatozoo, l'impacchettamento della cromatina nucleare per stabilizzare il DNA e proteggere la cellula (Upadhyay et al., 2022).

Da un punto di vista patologico eccessi di stress ossidativo inducono perossidazione lipidica con danni alle membrane della cellula (citoplasmatica, mitocondriale e nucleare) poiché tali membrane sono ricche in PUFA (acidi grassi polinsaturi) maggiormente sensibili all'azione dei ROS. La reazione con gli acidi grassi porta alla formazione di radicali perossilici, in grado di estrarre idrogeno dai lipidi e destabilizzare la membrana, i prodotti finali della perossidazione sono sostanze altamente reattive come la malondialdeide (MDA), il 4-idrossinonenale (4-HNE), l'acroleina, gli isoprostani, i quali minano l'integrità della membrana e la sua stabilità. Oltre alle membrane i ROS

colpiscono il DNA e l'mRNA reagendo con le basi azotate e i residui zuccherini inducendo modifiche alla sequenza di basi, sviluppo di siti privi di basi, delezioni, legami crociati, riarrangiamenti cromosomici e micro-delezioni. Le aldeidi prodotte dalla perossidazione lipidica si legano covalentemente con i residui di cisteina, lisina, e istidina interrompendo le modifiche post-traduzionali con effetti sul normale folding proteico, sui legami tra proteine e il blocco di alcune attività cellulari (catena di trasporto degli elettroni mitocondriale, induzione della cascata apoptotica intrinseca per esaurimento di ATP). Le conseguenze sono alterazioni alla morfologia dello spermatozoo con sviluppo di gameti anomali, alterazioni alla motilità progressiva e morte cellulare (Guthrie & Welch, 2012).

4.1.2. Plasma Seminale

Il plasma seminale (PS) rappresenta la frazione fluida in cui sono immersi gli spermatozoi. Si forma durante l'eiaculazione dall'unione di liquidi provenienti dall'epididimo e dalle ghiandole sessuali accessorie, tra le quali le più sviluppate e importanti nei bovini sono le vescichette seminali (Westfalewicz et al., 2017).

Le differenze di concentrazione dei singoli componenti nel PS bovino possono dipendere dall'alimentazione, dall'azione degli enzimi e dall'attività metabolica degli spermatozoi. Mentre le sue funzioni nutrizio-protettive, di stimolo alla motilità e alla sopravvivenza degli spermatozoi rimangono pressoché uguali all'interno della specie (Juyena & Stelletta, 2012).

Le principali componenti del PS bovino sono: enzimi come alanina amino transferasi (ALT), aspartato amino transferasi (AST), fosfatasi alcalina (ALP) e lattato deidrogenasi (LDH) che stabilizzano la membrana plasmatica e l'attività metabolica; ormoni come prostaglandina E (PGF-E) e testosterone (TST) correlati positivamente alla fertilità del liquido spermatico; insuline-like Growth Factor I (IGF-I) utile nel miglioramento della velocità lineare, nella riduzione dello spostamento laterale della testa (lateral head displacement, ALH) e direttamente proporzionale al tasso di fertilizzazione; proteine del plasma seminale bovino (BSP-proteins) efficaci in molti ruoli tra cui l'aumento della motilità dello spermatozoo dopo l'eiaculazione (Juyena & Stelletta, 2012). Tra le componenti biochimiche di maggior rilievo consideriamo le sostanze antiossidanti come superossido dismutasi (SOD), glutazione riduttasi (GR), glutazione perossidasi (GPx) e la catalasi (CAT) attivi nella protezione dalla perossidazione lipidica a cui gli spermatozoi

sono particolarmente sensibili (Tvrdá et al., 2013). È comprovato però che le specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS), comunemente presenti nel plasma seminale, sono benefiche a basse concentrazioni per permettere la capacitazione, l'iperattivazione degli spermatozoi e la reazione acrosomiale (Barati et al., 2020), mentre a dosi elevate compromettono la qualità spermatica (Kefer et al., 2009) A questo punto entrano in gioco i meccanismi antiossidanti enzimatici, precedentemente descritti, e i complessi non enzimatici come le cisteine, le N-acetil cisteine (NAC) e il glutatione (GSH). All'interno di questa classe abbiamo i tioli, ovvero residui di cisteina che contengono gruppi solfidrili (-SH) con attività stabilizzante, catalitica e regolatoria delle reazioni di ossidazione-riduzione (redox) (Vigolo et al., 2022).

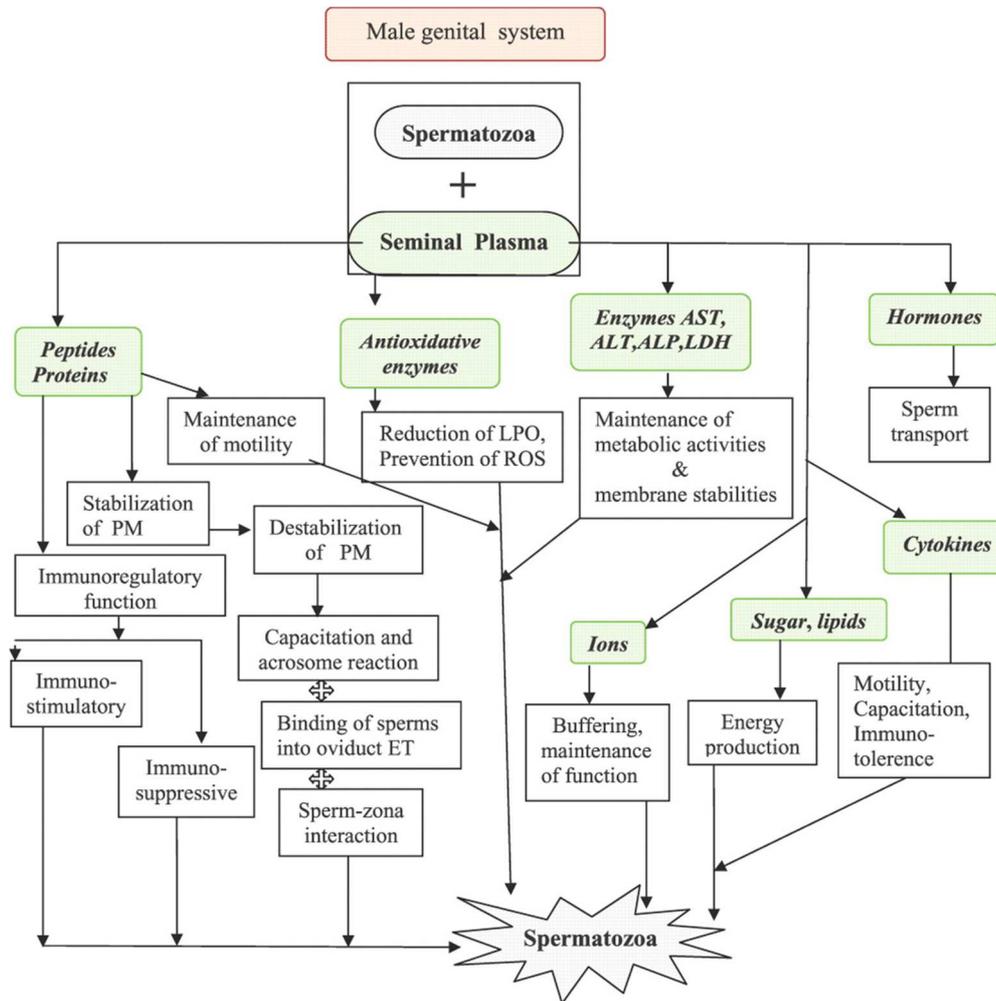


Figura 3. Descrizione delle funzioni dei componenti del plasma seminale (Juyena & Stelletta, 2012). Il PS è composto da peptidi e proteine che permettono il mantenimento della motilità degli spermatozoi, stabilizzano la membrana plasmatica (PM) oltre ad avere azione immuno-regolatoria (stimolatoria o soppressiva) verso la componente cellulare. Gli enzimi antiossidanti prevengono la perossidazione (LPO) da specie reattive dell'ossigeno (ROS), altri enzimi come amino aspartato transferasi (AST), amino alanino transferasi (ALT), fosfatasi alcalina (ALP) e lattato deidrogenasi (LDH) mantengono la stabilità delle membrane e agiscono in diverse attività metaboliche. Gli ioni hanno soprattutto un'azione tamponante, gli zuccheri producono energia ed infine le citochine permettono la motilità degli spermatozoi, la capacitazione e l'immunotolleranza.

4.2. Stress ossidativo: definizione e ruolo nella riproduzione del bovino

Lo stress ossidativo si sviluppa quando si ha un'eccessiva produzione di specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species, ROS) a discapito dei meccanismi antiossidanti della cellula e del plasma seminale. Il risultato è il danno alle macromolecole come lipidi, proteine, zuccheri e acidi nucleici (Hitit et al., 2020).

La produzione di ROS avviene per cause endogene ed esogene (figura 4):

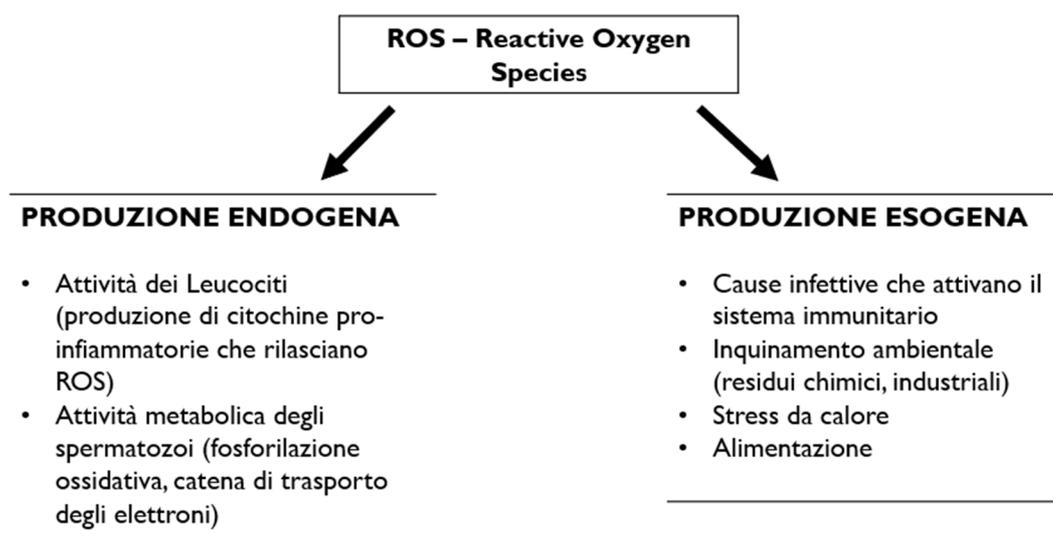


Figura 4. Descrizione delle principali cause della produzione di ROS nell'apparato riproduttore maschile (Kefer et al., 2009).

Come accennato precedentemente, le specie reattive dell'ossigeno sono: l'anione superossido (O_2^-) prodotto primariamente, a seguito l'ossigeno singoletto (O_2), il perossido d'idrogeno o acqua ossigenata (H_2O_2), il radicale perossilico (ROO^-) e i radicali idrossilici (OH^-) (Upadhyay et al., 2022).

La produzione di ROS avviene attraverso il metabolismo aerobico cellulare che utilizza ossigeno, inducendo la formazione di radicali liberi con uno o più elettroni spaiati (e^-) nell'orbitale più esterno. Di conseguenza, questi radicali liberi risultano essere particolarmente reattivi, per stabilizzarsi tendono ad accettare elettroni da altre molecole reagendo sia come sostanze riducenti sia come ossidanti. Tra i vari radicali che si formano, l' H_2O_2 in realtà non è un radicale ma partecipa alla formazione di specie reattive come l' OH^- . Infatti, proprio, H_2O_2 , OH^- e O_2^- inducono la perossidazione lipidica delle membrane cellulari (citoplasmatica, mitocondriale e nucleare) (Juárez-Rojas et al., 2022).

Come già visto parlando delle conseguenze del metabolismo aerobico nello spermatozoo (capitolo 4.1.1.), gli effetti dello stress ossidativo e dell'eccessiva produzione di ROS possono essere:

- I. Perossidazione lipidica: il target principale sono i PUFA (acidi grassi polinsaturi) presenti in abbondanza nelle membrane della cellula, soprattutto l'acido arachidonico (AA) e l'acido docosaesaenoico (DHA) (Van Tran et al., 2017). la catena di trasporto degli elettroni a livello mitocondriale porta alla formazione dell'anione superossido (O_2^-), che ha un ruolo riducente ma il suo acido coniugato, il radicale idroperossile (HOO), è in grado di dare inizio alle reazioni perossidative. Tali reazioni a catena portano alla formazione di idroperossidi fosfolipidici (ROOH) con danno alla membrana e perdita di permeabilità (Storey, 2008). I prodotti della perossidazione danneggiano poi le altre componenti come le proteine e il DNA (Castiglioni et al., 2021).
- II. Ossidazione proteica: i ROS attaccano covalentemente le proteine inducendo la carbonilazione (meglio definita come "carbonilazione primaria delle proteine"), ovvero la formazione di chetoni e aldeidi reattive. Più precisamente la formazione di gruppi carbonili (CT) avviene quando i ROS danneggiano gli aminoacidi delle catene laterali della lisina, arginina, prolina e treonina in presenza di metalli di transizione come ferro (Fe^{2+}) e rame (Cu^+). In altro modo, anche macromolecole ossidate come carboidrati e lipidi possono presentare gruppi carbonili che reagiscono con le catene laterali amminoacidiche delle proteine sviluppando la "carbonilazione secondaria delle proteine".

Questo fenomeno di ossidazione proteico è irreversibile e la degradazione di tali complessi proteici avviene per mezzo di specifiche proteasi, ma l'estensione del danno ossidativo può indurre la formazione di aggregati che risultano essere substrati deboli per la proteolisi, di conseguenza vengono accumulate (Celi & Gabai, 2015). L'accumulo ha una serie di effetti dannosi per la cellula, riassunti in figura 5.

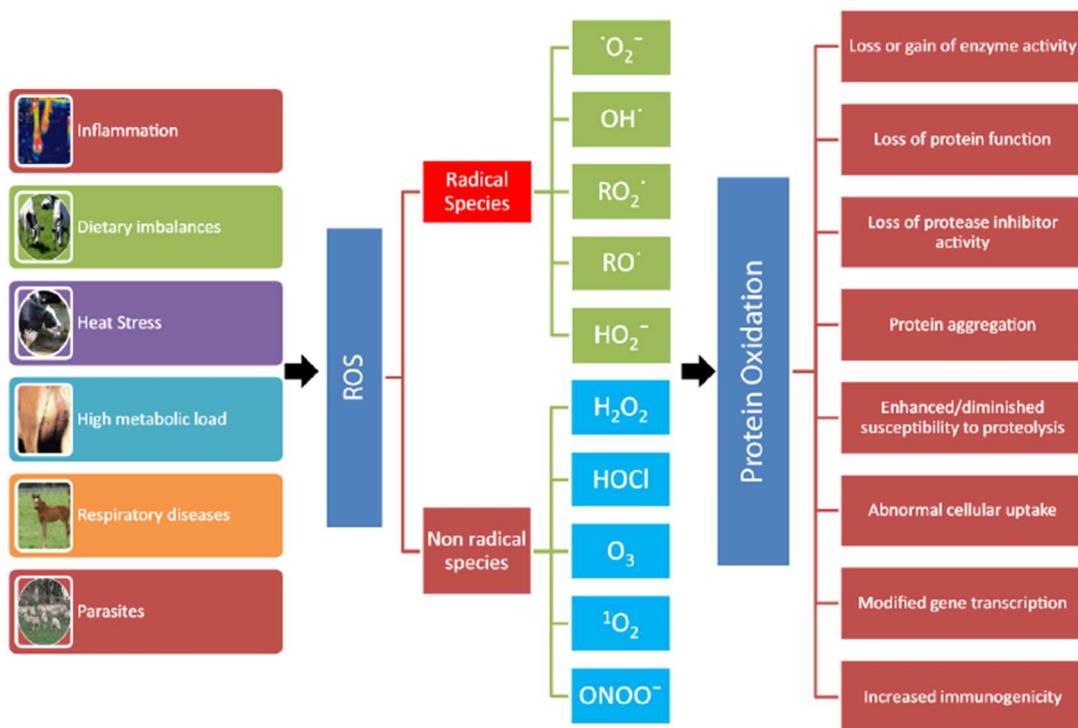


Figura 5. Uno stato infiammatorio, l'alimentazione, lo stress da calore, patologie infettive, respiratorie o metaboliche possono causare l'eccessiva produzione di ROS (radicali liberi e non) che inducono l'ossidazione proteica. Le cui conseguenze nella cellula possono essere: la perdita di attività enzimatica e della funzione proteica, riduzione della capacità inibitoria della proteina, aggregazione proteica, maggiore o minore suscettibilità alla proteolisi, assorbimento cellulare anomalo, trascrizione genica modificata e aumento dell'immunogenicità (Celi & Gabai, 2015).

- III. Ossidazione del DNA: i ROS possono attaccare anche gli acidi nucleici (DNA e mRNA) reagendo con le basi eterocicliche e gli zuccheri con conseguenti modifiche alle sequenze di basi, delezioni, formazione di cross-links, riarrangiamenti cromosomici e micro-delezioni. Più precisamente, i radicali liberi reagiscono con i doppi legami delle basi azotate ed estraggono l'idrogeno (H_2) legato al desossiribosio (o al ribosio nel caso dell'mRNA). Si ha la frammentazione del DNA e l'attivazione della via intrinseca dell'apoptosi. (Upadhyay et al., 2022).

4.2.1. Markers dello status ossidativo del plasma seminale

Nell'allevamento bovino la gestione della riproduzione avviene tramite l'utilizzo della fecondazione artificiale con seme di toro congelato. Infatti la crioconservazione del seme rappresenta una causa di stress fisico e biochimico, con conseguente perdita di motilità e integrità di membrana (Blanco-Prieto et al., 2023). Molti studi si concentrano sullo stress ossidativo indotto dalla crioconservazione come presentato dalla review di Ugur et al. (2019). Al di fuori del contesto della crioconservazione, studiare il plasma seminale bovino può essere utile per identificare anche parametri di qualità seminale e fertilità, utili a stimare le capacità del torello e le possibilità riproduttive (Willforss et al., 2021). Attualmente molti studi di proteomica e metabolomica si concentrano maggiormente su questi indicatori di fertilità, analizzando non solo le proteine presenti in caso di stress ossidativo (R. Sharma et al., 2013) ma anche tutti i metaboliti che compongono il plasma seminale stesso. Sono state dimostrate correlazioni tra alcuni metaboliti seminali (per esempio fruttosio, taurina, acido oleico e fosforico) e l'indice riproduttivo dell'animale (Memili et al., 2020), oppure altre ricerche hanno individuato elevati livelli di acidi organici e derivati, i cui prodotti di degradazione fungono da substrati della catena respiratoria comprovando un metabolismo energetico aerobio nello spermatozoo bovino (Menezes et al., 2019).

Per quanto riguarda invece i marcatori di stato ossidativo del plasma seminale, recentemente sono stati studiati i tioli, le Advanced Oxidation Protein Product (AOPP) e i carbonili (Vigolo et al., 2022).

I tioli rappresentano gli elementi antiossidanti che si contrappongono all'azione dei ROS, definendo la capacità antiossidante del plasma seminale. Infatti, sono rappresentati dai gruppi -SH presenti nell'albumina, nella cisteina, nel glutatione e nell'ergotioneina. La loro funzione è quella di agire come agenti riducenti rilasciando un atomo di idrogeno per detossificare i radicali liberi come lo ione superossido (O_2^-) e il radicale idrossile (HO) (Bilodeau et al., 2001). La cisteina, caratterizzata dai gruppi -SH, induce la sintesi di glutatione per stimolare l'effetto detossificante verso i ROS. Il glutatione è una classe di antiossidanti che funge da cofattore della glutatione perossidasi (GPx), principalmente ha il ruolo di catalizzare la reazione di riduzione dell'acqua ossigenata (H_2O_2) in idroperossidi (Tuncer et al., 2010). Si ottiene di conseguenza il glutatione ossidato

(GSSG), rigenerato successivamente dalla glutatione reduttasi (GR) e dall'NADPH (Bilodeau et al., 2001).

Le Advanced Oxidation Protein Products (AOPP) sono prodotti associati al danno ossidativo delle proteine (Vigolo et al., 2022). Quando le proteine vengono ossidate, subiscono variazioni nella loro struttura primaria, secondaria o terziaria. La denaturazione proteica può portare a frammentazione, cross-linking e formazione di aggregati insolubili, come riportato nel caso dell'albumina (Witko-Sarsat et al., 1996). Le AOPP si formano quindi dall'azione dei ROS sulle proteine, e portano alla formazione di di-tirosina e albumina modificata come prodotti finali della glicazione avanzata (AGE-HAS) (Witko-Sarsat et al., 1998). Nel plasma sanguigno, le AOPP derivano principalmente da aggregati o frammenti di albumina modificati per ossidazione e, poiché l'albumina è la proteina del plasma più abbondante, possono essere considerati un indicatore del danno ossidativo delle proteine plasmatiche (Kratz E. M. & Piwowar A., 2017). Sono espressione di danno proteico anche perché provengono dall'attivazione di monociti e neutrofili nei processi flogistici come mediatori pro-infiammatori (Colombo et al., 2015). Sebbene la concentrazione e la funzione delle AOPP siano già state studiate in varie matrici biologiche, solo lo studio preliminare di Vigolo et al. (2022) ha indagato il contenuto di AOPP nel plasma seminale e la sua relazione con i parametri fisiologici degli spermatozoi. In quello studio sono stati messi in relazione i biomarkers dello stato ossidativo nel PS e le caratteristiche cinetiche del seme fresco bovino, ed è stato osservato che i tioli e l'AOPP sono associati positivamente alla motilità del seme fresco (Vigolo et al., 2022).

Tuttavia, la composizione delle AOPP è eterogenea: possono contenere cromofori indotti da ossidanti clorurati, ponti di-tirosinici e disolfuro e gruppi carbonili. Pertanto, i test spettrofotometrici per la determinazione delle AOPP non sono specifici e potenzialmente rilevano un'ampia gamma di specie che emettono a quella determinata lunghezza d'onda (Witko-Sarsat et al., 1998). Le variazioni del contenuto di AOPP nel PS necessitano di un'indagine più approfondita. La determinazione quantitativa dei livelli di di-tirosina (DT) nel PS potrebbe essere un indicatore specifico di ossidazione delle proteine endogene presenti nelle AOPP. La DT è stata identificata come biomarcatore clinico dello stress ossidativo, dell'invecchiamento e di diverse condizioni patologiche come il morbo di Alzheimer e il morbo di Parkinson (Witko-Sarsat et al., 1996). Quindi, lo stress

ossidativo e i meccanismi endogeni possono provocare la formazione di legami covalenti tra due residui di tirosina con conseguente formazione di una modificazione post-traduzionale di DT.

Il vantaggio di valutare la DT come biomarcatore dello stress ossidativo si basa su:

- 1) la sua stabilità chimica (non reattiva ai cambiamenti di ossigeno/pH),
- 2) la di-tirosina libera non è incorporata nella sintesi proteica ex novo;
- 3) non viene rilasciata dopo la proteolisi delle proteine modificate ossidativamente.

L'attuale quantificazione della di-tirosina dagli idrolisati proteici si ottiene misurando una fluorescenza caratteristica a 420 nm dopo eccitazione a 315 nm (soluzioni alcaline) o 284 nm (soluzioni acide) (Malencik & Anderson, 2003). All'aumentare dei loro valori si correlano aumenti sia di di-tirosina (DT) sia di AGE-pentosidina, come marker di danno proteico mediato da sostanze ossidanti.

I carbonili (CT) sono utilizzati come biomarker generale di stress ossidativo delle proteine. I composti C-O si formano precocemente durante la “carbonilazione primaria delle proteine” e permangono a lungo, rendendogli vantaggiosi come indici da studiare. La formazione di carbonili può avvenire durante la crioconservazione e il successivo scongelamento, riducendo la qualità seminale (Mostek et al., 2017). Da questo studio di Mostek et al. (2017) è stato notato che la maggior parte delle proteine carbonilate giocavano un ruolo nella capacitazione dello spermatozoo. In un altro approfondimento di Mostek et al. (2018) viene definita una correlazione tra i livelli di ROS, la carbonilazione delle proteine e la qualità seminale.

4.3. Termoregolazione e stress da calore nel toro

4.3.1. Termoregolazione dell'apparato riproduttore nel toro

Nei bovini la temperatura scrotale è inferiore a quella corporea di circa 2-6°C per poter permettere le normali funzioni riproduttive dell'organo, quindi la produzione di spermatozoi morfologicamente normali e vitali (Kastelic, 2014). Il mantenimento di una temperatura inferiore è permesso da meccanismi fisiologici di diversa tipologia (Rahman et al., 2018):

- I. la presenza del plesso pampiniforme che scambia calore tra l'arteria testicolare e le vene,

- II. i muscoli dartos e cremastere che contraendosi e rilassandosi possono avvicinare o allontanare i testicoli in base alla temperatura ambientale,
- III. la presenza di ghiandole sudoripare sulla pelle dello scroto per la dissipazione del calore,
- IV. lo spessore della cute dello scroto e la presenza di pelo.

4.3.2. Stress da calore

Quando un animale deve mantenere in equilibrio la propria temperatura corporea utilizza diversi meccanismi, quali: la sudorazione attraverso la cute, le perdite sensibili tramite l'apparato respiratorio e la regolazione del tasso metabolico per aumentare la tolleranza al calore (Morrell, 2020).

Il fenomeno che si sviluppa, quando l'animale non è più in grado di reagire al controllo della propria temperatura corporea in relazione all'aumento di quella ambientale, prende il nome di stress da calore o heat stress. Questa situazione è causata da squilibri ambientali (come la radiazione termica, la luce solare, la temperatura dell'aria), da proprietà intrinseche dell'animale (metabolismo, perdita di umidità) e meccanismi di termoregolazione (come conduzione, convezione, radiazione ed evaporazione) (St-Pierre et al., 2003).

Per identificare lo stress da caldo si possono valutare gli effetti del calore sull'animale considerando cambiamenti comportamentali (es. aumento del consumo di acqua, riduzione dell'ingestione) e fisiologici (es. aumento degli atti respiratori e della temperatura rettale). A cui possiamo abbinare indicatori esterni come la temperatura ambientale (°C), l'umidità relativa (%), la velocità del vento (m/s) e il calcolo dell'indice temperatura-umidità (THI) (Ouellet et al., 2021).

Gli effetti dello stress da calore interessano l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e l'asse ipotalamo-ipofisi-corticale del surrene con conseguenze in merito alla gametogenesi e alla funzionalità delle proteine del plasma seminale (Morrell, 2020). Anche l'attività del sistema immunitario risulta compromessa a causa della secrezione di glucocorticoidi e catecolamine, le quali sopprimono la sintesi di alcune citochine come interleuchina 4 (IL-4), interleuchina 5 (IL-5), interleuchina 6 (IL-6), interleuchina 12 (IL-12), interferone-gamma (IFN-gamma) e tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (Anahí Lendez et al., 2020). Lo stress da caldo induce inoltre un aumento del consumo di acqua, una riduzione

dell'ingestione di alimento (dry matter intake, DMI) e ne consegue un ritardo sia nell'accrescimento sia nell'incremento di peso dell'animale (Kamal et al., 2018) (figura 6).

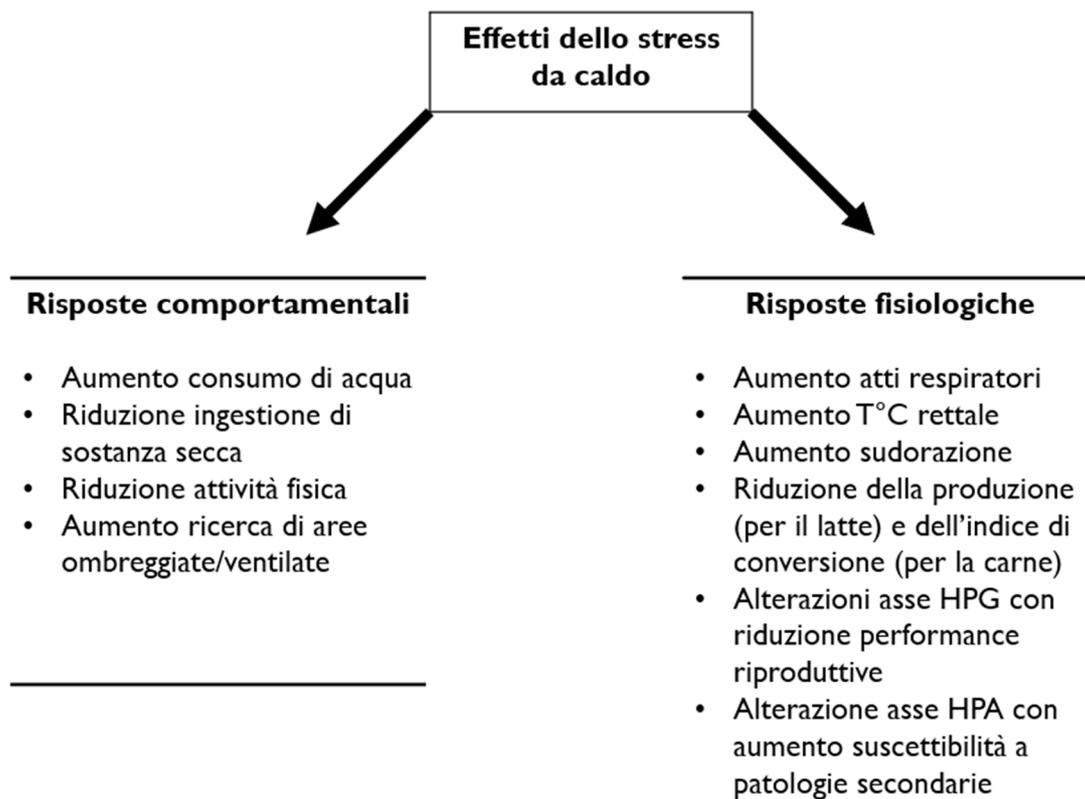


Figura 6. Effetti dello stress da calore sia nel comportamento che nella fisiologia del bovino (HPG: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi; HPA: asse ipotalamo-ipofisi-corticale del surrene) (Kamal et al., 2018; Morrell, 2020; Capela et al., 2022)

Per quanto riguarda il plasma seminale, le temperature elevate possono aumentare la produzione di ROS e ridurre i livelli di glutazione perossidasi (GPx) quindi limitare la difesa verso lo stress ossidativo (Takahashi, 2012), con conseguenze sulla frazione cellulare come: perossidazione lipidica delle membrane, denaturazione proteica, frammentazione del DNA e relativa incapacità di fertilizzazione e sviluppo embrionale. Tutto questo può indurre infine l'apoptosi cellulare (Morrell, 2020).

In molti studi si attesta come l'estate risulti essere il periodo dove la qualità spermatica è peggiore e vi è maggiore sensibilità alla crioconservazione. Si registrano risultati come:

riduzione della frazione di spermatozoi vivi, aumento dell'indice di frammentazione del DNA e parametri scarsi di motilità con riduzione di linearità (LIN) e rettilineità (STR) (Valeanu et al., 2015). In altri studi si dimostra che il seme di tori PR (Pezzata Rossa) in ambienti subtropicali sviluppa difetti morfologici superiori al 20%, mentre tori di razza Hereford nella stessa area climatica presentano alterazioni seminali del 5,5%. (Nichi et al., 2006). Altri approfondimenti in letteratura invece confermano che in ambienti tropicali la capacità riproduttiva dei tori non sembra cambiare particolarmente in relazione alla temperatura ma che ci sia un processo di adattamento al clima variabile tra individui e differente sulla base del management agricolo (Renato de Oliveira Menegassi et al., 2022).

4.3.3. THI ambientale

Per standardizzare la suscettibilità di un animale al calore si usa l'indice di temperatura e umidità (temperature-humidity index, THI), parametro di riferimento per la Livestock Weather Safety Index (LWSI). Il THI è un indice per quantificare le caratteristiche ambientali sulla base di temperatura e umidità, e può essere calcolato così (Mader et al., 2009):

$$\text{THI} = [0.8 \times \text{temperatura ambientale}] + [(\% \text{umidità relativa}/100 \times (\text{temperatura ambientale} - 14.4))] + 46.4$$

Si considera che un valore di THI uguale o maggiore di 72 sia indicativo di stress nell'animale e sviluppo di sintomatologia da stress da calore (Renato de Oliveira Menegassi et al., 2022), consideriamo invece valori di 68 nella norma (Wettemann & Boehmer, 2014).

5. MATERIALI E METODI

5.1. Disegno sperimentale

Per quanto concerne la prova, i giovani tori del centro genetico ANAPRI sono stati valutati al termine del performance test (all'incirca una decina di tori valutati al mese), per 18 mesi consecutivi. L'eiaculato prelevato da ciascun toro è stato analizzato per i principali parametri di qualità seminale e successivamente centrifugato per la raccolta del PS. Durante il periodo sperimentale, i parametri ambientali di temperatura e umidità sono stati registrati dalla stazione meteo limitrofa e dalle centraline installate presso il centro ANAPRI, per il calcolo del THI.

5.2. Azienda, animali e campionamento

Lo studio è stato svolto presso l'Azienda Sperimentale Ricchieri che ospita il centro genetico ANAPRI (Associazione Nazionale Allevatori Pezzata Rossa Italiana) con sede a Fiume Veneto (Pordenone, Friuli-Venezia Giulia, Italia Nord-Orientale, 45°91'90" N, 12°72'31"70 E).

Gli animali studiati sono tori selezionati annualmente dagli allevatori di Pezzata Rossa Italiana. I torelli arrivano al centro genetico a 25 ± 10 giorni di età, sono inizialmente testati per comprovare la negatività a Brucellosi, Tubercolosi, Leucosi Bovina Enzootica, Rinotracheite Infettiva Bovina e Diarrea Virale Bovina. Ricevono una dieta a base latte fino ai 60 giorni di età con accesso all'acqua e al pellet per l'avvio dello svezzamento.

Ai 3 mesi di età vengono suddivisi in gruppi omogenei di 5-6 animali per cominciare a 5 mesi il performance test che durerà fino ai 12 mesi di età. La loro alimentazione prevede la distribuzione ad libitum due volte al giorno di unifeed composto da crusca di grano, farina di soia, mais macinato, insilato di mais, girasole, pannelli di colza, orzo, polpa di barbabietola essiccata e un mix di minerali e vitamine. La composizione chimica della dieta presenta il 64.9% di sostanza secca (SS) composta da 6,3% di ceneri e la restante parte di sostanza organica (SO) di cui riconosciamo un 13,5% di proteina grezza (PG) e un 35.9% di fibra grezza (FG). Gli animali vengono pesati regolarmente ed in questa fase avviene la raccolta del seme e la sua analisi.

Alla conclusione del performance test ($387,2 \pm 11$ giorni, circa 12-13 mesi di età) si svolgono misurazioni accurate per ciascun toro in merito a statura, peso, profondità dell'addome, altezza al sacro, profondità e circonferenza del petto, altezza e profondità

della groppa ed infine circonferenza testicolare. A tali misurazioni si abbinano valutazioni morfologiche relative a taglia, muscolosità, conformazione di arti e piedi, Body Condition Score (BCS).

A questo punto i tori selezionati per l'inseminazione artificiale vengono divisi dagli animali disposti alla monta naturale per continuare con il Progeny Test, al contrario gli animali non confermati vengono inviati alla macellazione.

5.3. Schede Genealogiche

Le schede genealogiche individuali sono state concesse da ANAPRI per studiare singolarmente i torelli (figura 7). È un documento che riassume le informazioni del singolo toro in merito a:

- Segnalamento: razza, numero di matricola e numero aziendale, sesso, data di nascita, allevamento di nascita e allevamento tenutario
- Informazioni genetiche (registro di iscrizione, consanguineità, diagnosi padre e madre), indici produttivi (indice duplice attitudine IDA, latte in kg, grasso % e kg, proteine % e kg), indici funzionali (cellule somatiche, velocità di mungitura, facilità al parto, persistenza, longevità, fertilità), score ottenuti al performance test (attitudine alla carne, incremento medio giornaliero, taglia, muscolosità e arti al momento del performance test), indici morfologici (taglia, muscolosità, arti e piedi, mammella), test genetico (K-caseine, Beta-caseine,...)
- Informazioni in merito alla genealogia (padre e madre)
- Valutazione morfologica (taglia, muscolosità, arti e piedi e data di valutazione) con relativa valutazione morfologica della madre sugli stessi parametri con l'aggiunta delle informazioni su mammella, mungitura, temperamento e BCS.
- Informazioni sulla lattazione della madre e della nonna materna
- Performance test e rilevazioni: incremento medio giornaliero (IMG Kg/d o average daily gain ADG), ingestione alimentare residua (residual feed intake, RFI), sostanza secca ingerita, azoto urinario e fecale, altezza al sacro, altezza al garrese, circonferenza toracica e profondità toracica, lunghezza e larghezza groppa, circonferenza testicolare, spessore pelle. Con l'aggiunta di un grafico relativo all'incremento ponderale dove è possibile individuare il peso finale (PF, kg) e l'età (giorni) alla quale è stato raggiunto

ASSOCIAZIONE NAZIONALE ALLEVATORI BOVINI DI RAZZA PEZZATA ROSSA ITALIANA										Stampato il 09-02-2022 04:20 PM				
SCHEDE GENEALOGICHE INDIVIDUALI														
Razza: PRI-SIMMENTAL Matricola: IT030990398778 Nome:			Aziendale: 00278 Sesso: M Data nascita: 04/11/2020 Gemello: Stato: V			AUA Nascita: 2794001 Allev. nascita: TENUTA MARIANIS S.R.L. SOC. AGR. - Palazzolo dello Stella (UD) AUA Tenutario: 9900099 Allev. Tenut.: ANAPRI - CENTRO GENETICO - Fiume Veneto (PN)								
INFO GENETICHE		INDICI PRODUTTIVI		INDICI FUNZIONALI		PERFORMANCE TEST		INDICI MORFOLOGICI		TEST GENETICI				
Registro: MASCHI IN SELEZIONE % Sim: 94 % Mon: 4 % Rh: 2 Consanguinità: 14.4 Tipo diagnosi: DNA Genotipo Diagnosi padre: PADRE VERIFICATO Diagnosi madre: MADRE VERIFICATA		Tipo indice: G Rank: 99 IDA: 1940 Attend. IDA: 56 Latte Kg: 903 Attend. Latte: 51 Grasso %: 0.18 Grasso Kg: 51 Prot. %: 0.00 Prot. Kg: 31 Data indici: 18-01-2022		Indice Attend. Cellule somatiche: 108 53 Velocità mungitura: 112 72 Facilità al parto: 95 72 Persistenza: 92 71 Longevità: 93 66 Fertilità: 79 65		Attitudine carne: 118 Incremento medio gg: 128 Taglia perf. test: 110 Muscolosità perf. test: 113 Arti perf. test: 106		Indice Attend. Taglia: 102 77 Muscolosità: 94 65 Arti e piedi: 95 59 Mammella: 122 78		K-caseine: AA Beta-caseine: A2A2 Aracnom.: F Nanismo: F BMS: F Trombopatia: F ZDL: F FSH2: F FH4: F FHS: F BH2: F Polled: pp*				
GENEALOGIA						VALUTAZIONE MORFOLOGICA								
PADRE IT093990191493 Az.: 00082 Nome: CTM INVICTUS Data nascita: 21/10/2017 Razza: PRI - SIMMENTAL IDA: 1595 Rank: 99 Attendib.: 62 Latte Kg: 984 Grasso %: 0.13 Gr.Kg: 50 Prot. %: -0.05 Pr.Kg: 30 Cell. som.: 110 Mungib.: 107 Taglia: 101 Muscol.: 99 Arti: 107 Mam.: 115 Fertilità: 84 Longev.: 103 Persist.: 85 Tipo: G			AT000303304428 Nome: HERZSCHLAG Data nascita: 10/06/2014 Razza: PRI - SIMMENTAL IDA: 2134 Rank: 99			DE000941688886 20/07/2007 HUTERA TA PRI - SIM. IDA: 1210 Rank: 99			Taglia Muscolosità Arti e Piedi Mammella Punt. finale Mungib. Temper. BCS Data valutazione 85 84 81 N.D. N.D. N.D. N.D. 16/12/2021					
MADRE IT030990350986 Az.: 00403 Nome: AZ 403 Data nascita: 25/04/2018 Razza: PRI - SIMMENTAL IDA: 1434 Rank: 99 Attendib.: 65 Latte Kg: 993 Grasso %: 0.15 Gr.Kg: 52 Prot. %: -0.03 Pr.Kg: 32 Cell. som.: 113 Mungib.: 104 Taglia: 102 Muscol.: 86 Arti: 93 Mam.: 117 Fertilità: 84 Longev.: 89 Persist.: Tipo: G			AT000303304428 Nome: HERZSCHLAG Data nascita: 10/06/2014 Razza: PRI - SIMMENTAL IDA: 2134 Rank: 99			AT000246291222 29/04/2012 LEONIE PRI - SIM. IDA: 875 Rank: 97			VALUTAZIONE MADRE Taglia Muscolosità Arti e Piedi Mammella Punt. finale Mungib. Temper. BCS Data valutazione 80 80 76 79 N.D. N.D. 3.5 07/04/2021					
LATTAGIONI						PERFORMANCE TEST								
LATTAGIONI MADRE N. Anno Età GG Latte kg Gr.kg Gr.% Prot.kg Prot.% 1 2020 206 305 10446 431 4.13 339 3.25 Vit 1 387 13006 549 4.22 439 3.38						RILEVAZIONI FINE PERFORMANCE TEST I.M.G.(Kg/d): 1.746 R.F.I.: 0.088 S.S. ingerita: 11.138 CH4: 241 N urinario: 110 N fecale: 65 Alt. sacro: 138 Alt. garrese: 133 Circ. toracica: 200 Prof. torac.: 72 Lung. groppa: 51 Larg. groppa: 53 Circ. testicoli: 37,00 Spess. pelle: 2.20								
LATTAGIONI NONNA MATERNA N. Anno Giorni Latte kg Gr. kg Gr.% Prot.kg Prot. % Pri 1 2018 305 9556 303 3.18 311 3.25 Migi 3 2020 305 12749 397 3.11 406 3.19 Vit 4 1179 46400 1400 3.02 1512 3.26						INCREMENTO PONDERALE 								
ULTIMA FECONDAZIONE														
Data fecondazione:		Razza toro:		Matricola toro:		Nome toro:								

Figura 7. Esempio di scheda genealogica fornita da ANAPRI

5.4. Dati relativi ai parametri ambientali

Per quanto riguarda i parametri ambientali sono state utilizzate le misurazioni in merito all'umidità relativa e alla temperatura ambientale.

I dati di temperatura e umidità sono stati acquisiti dalla stazione meteo più vicina al centro genetico, ottenuti consultando il sito <http://omnia.meteo.fvg.it>. Più precisamente sono stati scelti i dati di temperatura e umidità di ogni ora dei 60 giorni precedenti al momento del prelievo di seme, considerando che la spermatogenesi avviene nei due mesi precedenti. È stato calcolato il THI per ogni ora e infine la media a giornata.

Sono state montate quattro centraline all'interno delle stalle dove sono allevati gli animali in esame per il monitoraggio della temperatura e umidità relativa nell'area di stabulazione di modo da ottenere il THI dell'ambiente proprio in cui vivono gli animali. Per i primi tre mesi dell'esperimento, in cui non erano presenti le centraline, i dati aziendali sono stati ricavati dalla stazione meteo calcolando un'equazione di regressione ($r^2=0.7$).

Dopo aver raccolto i THI di ogni ora dei 60 giorni precedenti ad ogni raccolta, è stato costruito un dataset e sono state prese in considerazione 4 variabili:

- la mediana del THI dei 60 giorni precedenti
- la mediana del THI delle 24h precedenti
- la mediana del delta THI dei 60 giorni precedenti
- la mediana del delta THI delle 24h precedenti

Il delta è stato calcolato sottraendo alla media dei THI delle 12h notturne (dalle 20.00 alle 8.00), la media dei THI delle 12h diurne precedenti. Da questi valori è stata stimata la mediana sia per le 24h sia per i 60g.

5.5. Valutazione dei parametri seminali

5.5.1. Valutazione dei parametri seminali in campo

In campo sono state svolte le analisi seminali preliminari su un campione formato da 120 torelli in performance test.

Il protocollo applicato è stato approvato dalla Commissione per il Benessere degli Animali dell'Università di Udine (Prot. OPBA N. 01/2024) e segue la direttiva UE N. 2020/63 e il regolamento UE N. 176/2010. Il seme è stato prelevato usando la vagina artificiale al secondo salto su tre svolti da parte dell'animale in presenza di un altro manzo contenuto. La vagina artificiale era collegata ad una provetta di 15 mL (codice 62.554.502, Sarsted s.r.l., Verona, Italia) utile alla raccolta seminale.

Nei casi in cui i principali parametri di qualità seminale valutati in campo non fossero risultati appropriati, si procedeva con un'ulteriore raccolta quindici minuti dopo.

La valutazione della qualità seminale ha seguito le linee guida della Società di Teriogenologia (Society of Theriogenology, SFT) (Koziol et al., 2022).

Dopo una prima valutazione del volume di eiaculato è stata svolta l'esaminazione morfologica e di vitalità degli spermatozoi da parte del professor Stradaioli dell'Università di Udine. È stato predisposto un vetrino con 7 µl di seme e 90 µl di Eosina Nigrosina: durante la colorazione l'eosina entra nelle cellule spermatiche con membrana cellulare danneggiata e le colora di rosso. La tintura di nigrosina offre un contrasto scuro per migliorare la definizione degli spermatozoi viventi non colorati. È stato utilizzato un microscopio ottico in campo chiaro a 1000X ingrandimenti (Orthoplan, Leitz, Germania) per visualizzare circa 200 spermatozoi e stabilire la % di cellule normali e anormali. Le anomalie degli spermatozoi sono state raggruppate in due categorie (maggiori e minori) come esposto dalla SFT. Come anomalie maggiori sono state classificate: gocce

citoplasmatiche prossimali, difetti della testa (teste piegate o piriformi), code arrotolate, difetti di immaturità come doppie code o doppie teste, crateri nucleari e acrosomi piegati. Nelle anomalie minori si distinguono invece: gocce citoplasmatiche distali, teste staccate, code piegate ad anello, spermatozoi macro e microcefalici e flagelli eccentrici o abassiali (Pause Corte et al., 2022).

Successivamente alle valutazioni morfologiche sono state effettuate le analisi di concentrazione e motilità da parte del gruppo di ricerca dell'Università degli Studi di Padova. Prima di tutto è stato diluito il seme 1:1 utilizzando il medium Tyrode's (500 µl di seme con 500 µl di medium). Per le analisi di concentrazione il seme è stato diluito ulteriormente 1:200 con NaCl 2% (10 µl di seme già diluito precedentemente e 1990 µl di NaCl), e predisposte due aliquote da 10 µl per la conta attraverso la camera di Burker (figura 8).

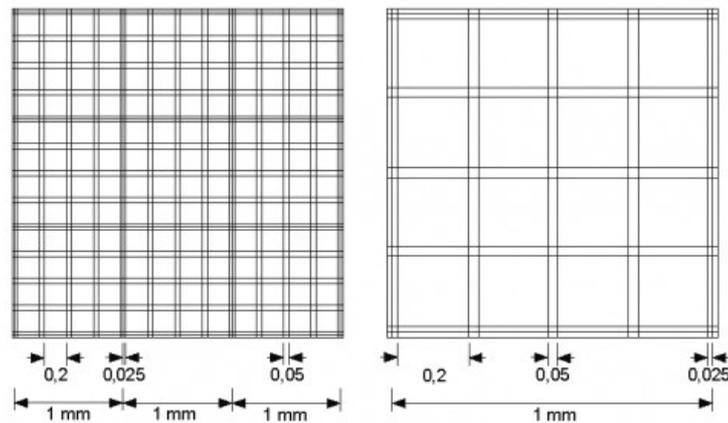


Figura 8. Camera di Burker

Il calcolo della concentrazione viene eseguito utilizzando la seguente formula:

$$C = N/5 \times 250 \times FD \times FC$$

Dove:

C = concentrazione spermatica/mL;

N = numero di spermatozoi contati in 5 quadrati piccoli;

250 = consente il calcolo del numero di spermatozoi in un mm³ (un quadrato piccolo corrisponde a 1/250 mm³);

FD = fattore di diluizione (es. 1:100 = 100, nel nostro caso sarà 1:400 = 400 oppure 1:800 = 800);

FC = fattore di conversione (mm³= mL = 1000).

L'analisi della motilità è svolta in accordo al protocollo di Giaretta et al. (2017). Si diluisce il seme (1:1) con l'extender Tyrode alla concentrazione di 50×10^6 spermatozoi/mL. Le eppendorf così preparate vengono poste a 37°C per 5 minuti. Viene utilizzato un microscopio ottico Nikon (mod. Eclipse E200, Nikon, USA) a contrasto di fase negativo con l'obiettivo a 10X collegato ad un computer per la registrazione dei video. Sullo stage preriscaldato a 37°C del microscopio si dispone un vetrino di Leja® (Microptic S.L., Spain). 3 μl di ciascun eiaculato, precedentemente diluito e riscaldato come descritto sopra, vengono inseriti in una camera del vetrino. Per ciascun eiaculato sono stati registrati almeno 10 video di 3 secondi ciascuno alla risoluzione di 800×600 pixels e 60 frame per secondo (fps), con l'obiettivo di visualizzare la motilità di circa 250 cellule. I video sono salvati su un hard-disk in formato AVI e analizzati successivamente con il plugin CASA_bgm (computer-assisted sperm motility analysis) nel programma Image J.

I parametri analizzati dal programma sono: motilità totale (total motility, TM, %), motilità progressiva (progressive motility, PM, %), velocità curvilinea (curvilinear motility, VCL, $\mu\text{m/s}$), velocità media (average path velocity, VAP, $\mu\text{m/s}$), velocità rettilinea (straight-line velocity, VSL, $\mu\text{m/s}$), rettilineità (straightness, STR, %), linearità (linearity, LIN, %), spostamento laterale della testa medio (average lateral head displacement, ALH, μm), spostamento laterale della testa massimo (maximum lateral head displacement, mALH, μm), frequenza (beat cross frequency, BCF, Hz) e oscillazione (wobble, WOB, %).

Dopo l'importazione del video, si imposta la modalità "convert to greyscale" (convertire in scala di grigi), si selezionano i frames centrali (60-120) e si modifica il threshold per oscurare il fondo ed evidenziare la testa degli spermatozoi.

I parametri del setting per permettere le analisi di motilità sono: lunghezza minima del tracciato (minimum track length) di 30 frames, velocità spermatica massima (maximum sperm velocity between frames) di 20 pixels/s, area di pixels minima di 40 e massima di 250 pixels richiesta per l'analisi (minimum sperm area e maximum sperm area), mentre VSL, VAP, VCL sono settati a 15, 15 e 25 $\mu\text{m/s}$ per considerare uno spermatozoo motile. Vengono considerati spermatozoi lenti quelli con $\text{VAP} \leq 50 \mu\text{m/s}$, spermatozoi medi con VAP compresa tra 50 e 75 $\mu\text{m/s}$.

I campioni seminali sono stati tutti centrifugati 2 volte per 15' a 12 000 RCF, è stato prelevato il surnatante ovvero il plasma seminale e aliquotato in eppendorf cryostorage (con volumi minimi di 450 µl e 250 µl) per poi essere depositato in azoto liquido.

5.5.2. Valutazione dei parametri seminali in laboratorio

Nei laboratori di Fisiologia del Dipartimento di BCA (Biomedicina Comparata Alimentazione) presso l'Università degli Studi di Padova sono state svolte le successive analisi di laboratorio.

I parametri valutati sono stati i seguenti:

- a) Proteine Totali (TP): è stato seguito il protocollo specifico mediante il kit diagnostico BCA Protein Assay Kit (Pierce Biotechnology 3747 N. Meridian Road, PO Box 117 Rockford, IL 61105 USA).
- b) AOPP: metodo spettrofotometrico di Witko-Sarsat (Witko-Sarsat et al., 1996; Witko-Sarsat et al., 1998) su lettore di micropiastre (VICTOR X100, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA).
- c) Tioli: è stato svolto il dosaggio utilizzando il reagente di Ellman, DTNB (5,5'-ditiobis-(acido 2-nitrobenzoico)) sulla base degli studi in bibliografia (Ellman, 1959; Aida A. Mahmoud, 2013).
- d) Carbonili (CT): mediante derivatizzazione con DNPI secondo il metodo di Levine et al. (1990) e Dalle-Donne et al. (2003)
- e) Testosterone (TST): estrazione dello steroide e dosaggio radioimmunologico, sulla base dello studio di Brown et al., 1994.
- f) Di-tirosina (DT): sia in spettrofotometria a fluorescenza per valutare il contenuto di DT totale; sia mediante Western Blotting solo su 24 campioni selezionati in base al contenuto di AOPP, di modo da separare le proteine a secondo del loro peso molecolare.

Tali parametri sono stati valutati sul PS (PT, AOPP, Tioli, CT, TST, DT) dei campioni precedentemente ottenuti in campo e conservati in azoto liquido.

ESTRAZIONE ED ANALISI RADIOIMMUNOLOGICA DEL TESTOSTERONE (TSTS)

Per quanto riguarda l'estrazione del testosterone, viene preso come esempio lo studio di (Brown et al., 1994). Si utilizzano 50 μ l di plasma seminale, a cui si aggiungono 5 ml di etanolo (90%). La provetta viene agitata per 5 min e fatta bollire per 20 min, di modo da far evaporare l'etanolo.

Si centrifugano le provette per 10 min a 2500 g, dopo di che si decanta il surnatante nelle provette coniche, i campioni sono portati a secco e lavati con 1 ml di etanolo assoluto. Viene ripreso il residuo con lo stesso volume di Buffer RIA 250 μ l (PBS 100mM pH7,2 con 0,1% BSA). Il dosaggio del TST è stato così eseguito mediante saggio radioimmunologico (RIA) per competizione (Simontacchi et al., 2004) La quantità di estratto analizzata è 100 μ l/well. I valori di TST ottenuti sono stati moltiplicati per il fattore di diluizione.

DETERMINAZIONE DELLA DI-TIROSINA (metodo in fluorescenza)

La determinazione della produzione di DT è stata analizzata in fluorescenza usando lettore di micropiastre VICTOR X100 (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) (Heinecke et al., 1993). La concentrazione finale è stata calcolata dall'intensità di fluorescenza della curva di calibrazione utilizzando uno standard di Di-tirosina. Lo standard è stato diluito in modo seriale 1:2 con PBS 10mM (0,006-2,9 μ M), mentre tutti i campioni sono stati portati ad una diluizione di 1 mg/ml con PBS 10mM. Sia la curva standard che i campioni (100 μ l/well) sono stati depositati su micropiastro (OptiPlate 96-well bianca, Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) e letti sul lettore di fluorescenza mediante filtri di eccitazione/emissione di 325 e 410 nm rispettivamente. La quantità di di-tirosina presenti è stata calcolata dall'interpolazione della curva di taratura ed espressa per μ M/mg di proteina.

SEPARAZIONE ELETTROFORETICA

Per la valutazione delle DT sono stati scelti 24 campioni, 12 con valori di AOPP alte e 12 con valori di AOPP basse. Sono stati divisi in due gel, ogni gel (1A-1B / 2A-2B) con 12 campioni (6 con AOPP alte e 6 con AOPP basse).

I campioni di plasma seminale sono stati separati mediante corsa elettroforetica in condizione riducente (SDS_PAGE). Tutti i campioni sono stati portati ad una diluizione di 4mg/ml con PBS 10 mM ed addizionati di un pari volume di 2X Sample Buffer (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) nel rapporto 1:1 (volume:volume) così da ottenere la diluizione finale di 2mg/ml. Successivamente, sono stati agitati ed incubati a 95 °C per 2 minuti, per essere poi congelati a -20 °C fino al momento delle analisi.

La separazione elettroforetica è stata eseguita con l'utilizzo di gel precostituiti in poliacrilammide 12% (ThermoFischer, Bolt Bis-Tris Plus 12% 1mm) progettati per la separazione ottimale di un'ampia gamma di dimensioni proteiche in condizioni di denaturazione.

I campioni sono stati caricati (10 µg/5µl lane) nelle rispettive lane con il 3 µl di marker (SeeBlue Plus2 Pre-stained Protein Standard, 3-198 KDa (ThermoFischer, Monza, Italia).

La migrazione delle proteine è stata eseguita utilizzando un mini-Gel Tank (ThermoFischer, Monza, Italia) e power supply 1001 (Amersham Biosciences, NJ, USA) con tampone di corsa (Running Gel 1x (ThermoFischer, Monza, Italia) a 240 mA, 200V e 15W per 50 minuti per due gel.

Completata la separazione è stata eseguito il trasferimento delle proteine su nitrocellulosa per procedere con l'identificazione della DT mediante anticorpi (WB 1A-1B) ed anche la colorazione del gel (WB 2A-2B) per analizzare l'aspetto proteico del campione in esame.

Tabella 1. Parametri settati dell'apparecchiatura elettrica per 1 o 2 gel

	1 gel	2 gel
Corrente	120 mA	240 mA
Potenziale	200 V	200 V
Resistenza	1000 W	1000 W

COLORAZIONE SDS-PAGE

A corsa elettroforetica completata i gel 2A e 2B sono stati smontati dai supporti in plastica e lavati con acqua deionizzata per 5 min e colorati con EZBlue Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) 20 ml/mini gel. Trascorso un tempo tra i 40-

60 min sono stati lavati con acqua e l'immagine del gel è stata acquisita con I-Bright Immager (ThermoFischer, Monza, Italia).

L'elaborazione dell'immagine ed il calcolo dei pesi molecolari delle bande è stato eseguito con I-Bright Image Report (ThermoFischer, Monza, Italia).

TRASFERIMENTO SU NITROCELLULOSA

Le proteine dei gel 1A e 1B sono state trasferite tramite Power Blotter System XL (ThermoFischer, Monza, Italia). La strumentazione richiede l'utilizzo di Power Blotter Transfer Stacks (PB3210 ThermoFischer, Monza, Italia) che comprende la nitrocellulosa e la componente assorbente già imbevuta di buffer per trasferimento. Si assembla il kit di trasferimento e si avvia il programma adeguato (2,5 mA/2 minigel) per il trasferimento di proteine con un peso molecolare compreso tra i 25-150 kDa.

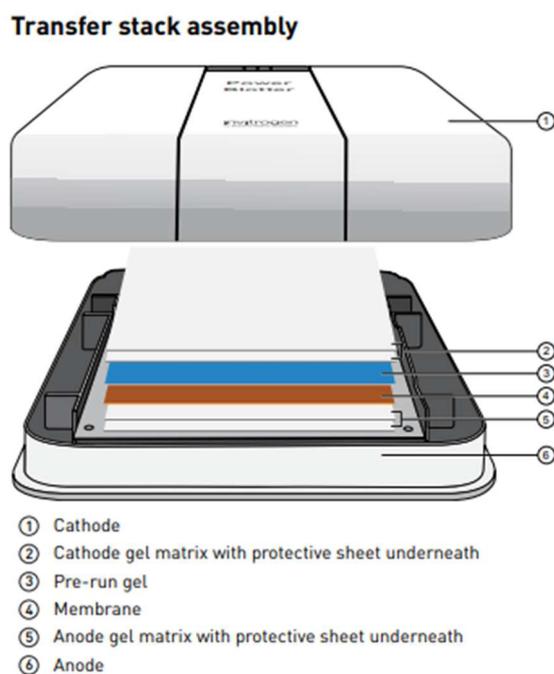


Figura 9. Pacchetto contenente la membrana di nitrocellulosa

Al termine del trasferimento, della durata di 7 minuti, la membrana è stata lavata con acqua e immersa per 5 min. in Ponceau S (Sigma Saint Louis, MO 63103, USA) (Figura 10). Questo passaggio è stato utile per verificare l'efficacia del trasferimento. Successivamente la membrana è stata lavata con acqua deionizzata fino al completo scoloramento.

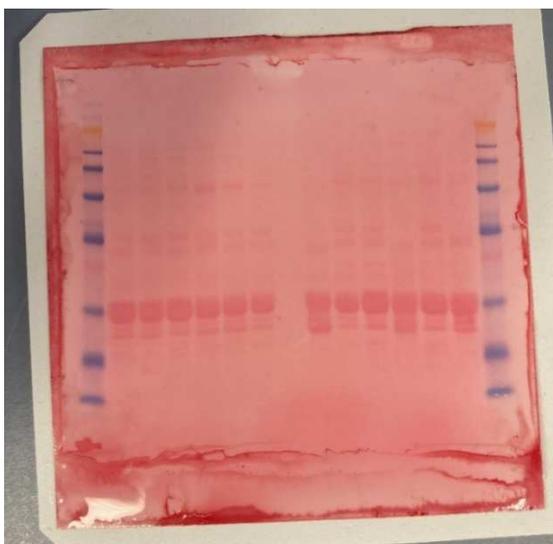


Figura 10. Membrana con colorazione Ponceau S.

WESTERN IMMUNOBLOTTING (WIB) per l'identificazione della DT

È stato preparato il T-PBS Buffer (PBS 100mM) con 0,05% Tween 20 (Sigma Saint Louis, MO 63103, USA).

Tabella 2. Componenti tampone PBS

T-PBS 0.05% T20

PBS pH 7.4	1000 ml
TWEEN 20	0.5 ml

I siti non specifici sono stati bloccati immergendo la NC nella Soluzione di Blocco T-PBS al 10% v/v di LATTE (Plasmon 2/ T-PBS) 25 ml per 1 ora a temperatura ambiente.

Tabella 3. Componenti T-PBS con latte

T-PBS all'10% di LATTE

T-PBS	90 ml
latte	10 ml

Dopo aver aspirato la soluzione di blocco, la membrana è stata posta in incubazione per 1 h a temperatura ambiente con 10 ml di anticorpo primario (anti-DT mAb) diluito 1/1000

(Monoclonal Antibody to Di-tyrosine / DT Purified, OriGene EU-Acris Antibodies GmbH GERMANY).

Dopo 3 lavaggi di 10 min. con 25 ml di T-PBS la membrana è stata incubata per 1 ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario GAM-HRP 1/20000 (Goat Anti-mouse coniugato alla perossidasi, Thermo) per 60 min a temperatura ambiente.

Dopo gli ultimi 3 lavaggi con T-PBS la membrana è stata inserita nell' iBright Imaging Systems (ThermoFischer, Monza, Italia) per l'acquisizione dell'immagine luminosa. Infatti la perossidasi dell'anticorpo secondario legato all'estremità dell'anticorpo anti-DT precedentemente utilizzato, reagisce con il luminolo (Millipore by Sigma Saint Louis, MO 63103, USA), dando l'effetto di chemiluminescenza. L'immagine così acquisita è stata elaborata tramite il software specifico iBright Analysis Software (ThermoFischer, Monza, Italia) e i dati esportati su di un foglio di lavoro Excel per l'elaborazione statistica.

5.6. Analisi dei dati

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il software R (versione 4.3.0) e per la significatività statistica è stato considerato il valore soglia di $p < 0.05$. È stata verificata la distribuzione delle variabili seminali tramite il test Shapiro. In alcune variabile è stata applicata una trasformazione logaritmica per ottenere una distribuzione normale.

Le variabili sono state descritte come media e deviazione standard. Una prima analisi è stata finalizzata a esplorare la relazione tra i parametri di qualità seminale e i parametri ormonali e di stress ossidativo del plasma seminale tramite modelli di regressione lineare. Di seguito, per studiare l'effetto del THI ambientale sui parametri seminali sono state calcolate le mediane di THI delle 24h e dei 60 giorni precedenti al prelievo del seme e le differenze di THI tra le ore notturne (dalle 20.00 alle ore 8.00) e le ore diurne (dalle 8.00 alle 20.00) del giorno precedente, espresse anche queste ultime come delta notte-giorno delle 24h e mediana del delta notte-giorno dei 60 giorni precedenti al prelievo.

Sono stati quindi eseguiti dei modelli di regressione lineare, includendo le variabili ambientali come fattori indipendenti e i parametri seminali come variabili dipendenti. Il toro è stato incluso in ciascun modello come fattore random.

Infine, le relazioni tra la concentrazione di AOPP del plasma seminale e l'intensità di fluorescenza della di-tirosina sono state valutate tramite il test di correlazione di Pearson.

6. RISULTATI

6.1. Parametri fisiologici del seme e del plasma seminale

6.1.1. Statistica descrittiva

Sono analizzati i parametri del seme e del plasma seminale di 120 torelli.

Relativamente ai parametri morfo-funzionali degli spermatozoi nella seguente tabella sono descritte le variabili di: volume, concentrazione, vitalità e morfologia.

Tabella 4. Medie e deviazioni standard (DS) di volume, concentrazione (conc. calcolata su 10 milioni di spermatozoi), spermatozoi normali (spz norm.), spermatozoi normali vivi (spz norm. vivi), anomalie maggiori (anomalie mag.) e anomalie minori (anomalie min.).

Variabile	Media ± DS
VOLUME (mL)	3,21 ± 1,13
CONC. (SPZ x 10 ⁶ /mL)	1260,63 ± 518,48
SPZ NORM. (%)	80,12 ± 12,50
SPZ NORM. VIVI (%)	56,14 ± 16,74
ANOMALIE MAG. (%)	7,71 ± 4,66
ANOMALIE MIN. (%)	10,33 ± 6,36

Di seguito vengono descritti i parametri di motilità seminale.

Tabella 5. Medie e DS dei parametri di motilità

Variabili	Media \pm DS
TM (%)	42,74 \pm 20,84
PM (%)	40,34 \pm 20,30
VAP ($\mu\text{m/s}$)	80,88 \pm 11,80
VCL ($\mu\text{m/s}$)	126,9 \pm 21,87
VSL ($\mu\text{m/s}$)	72,84 \pm 13,17
LIN (%)	0,59 \pm 0,07
STR (%)	0,9 \pm 0,02
ALH (μm)	5,43 \pm 0,84
mALH (μm)	12,03 \pm 1,92
BCF (Hz)	33,07 \pm 3,10
WOB (%)	0,93 \pm 3,00
SLOW (%)	17,85 \pm 9,81
MEDIUM (%)	26,39 \pm 13,81

Infine, prendendo in esame il plasma seminale sono stati studiati i markers dello stress ossidativo di PS.

Tabella 6. Medie e DS di AOPP, CT, tioli, TST, DT.

Variabili	Media \pm DS
AOPP (nmol/mL)	80,03 \pm 25,52
CT (nmol/mL)	3,96 \pm 1,15
THIO (nmol/mL)	84,96 \pm 57,56
TST (ng/mL)	2,03 \pm 1,70
DT_UAF	4,54 \pm 7,36

6.1.2. Relazioni tra i parametri del seme e del plasma seminale

È possibile evincere, dall'analisi dei dati, le relazioni significative tra il contenuto di AOPP, Tioli e TST con alcuni parametri fisiologici del seme.

Dai modelli di regressione lineare la TM, la PM risultano influenzate in maniera positiva dal contenuto di AOPP (nmol/mL) del PS, mentre la CONC del seme risulta influenzata positivamente sia dalle AOPP che dai tioli (nmol/mL) del PS. Di seguito i grafici riportano queste relazioni significative ($p < 0,05$).

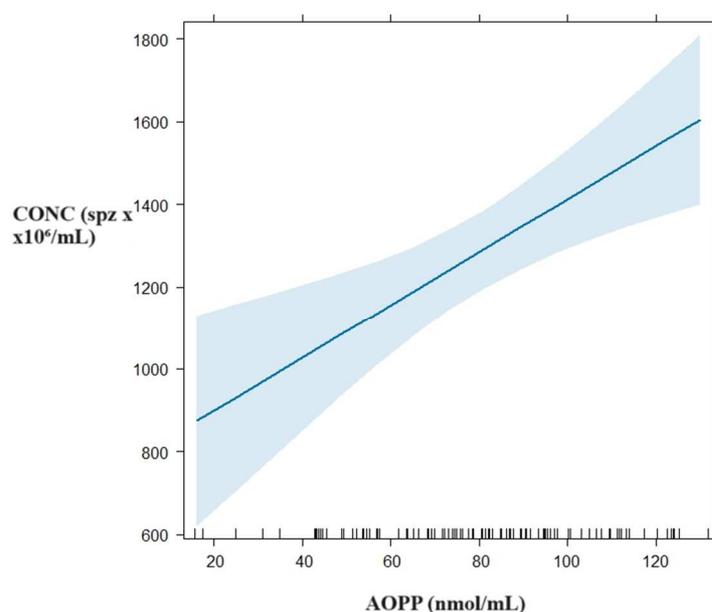


Figura 11. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile AOPP (nmol/mL) relazionata alla CONC (10⁶/mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

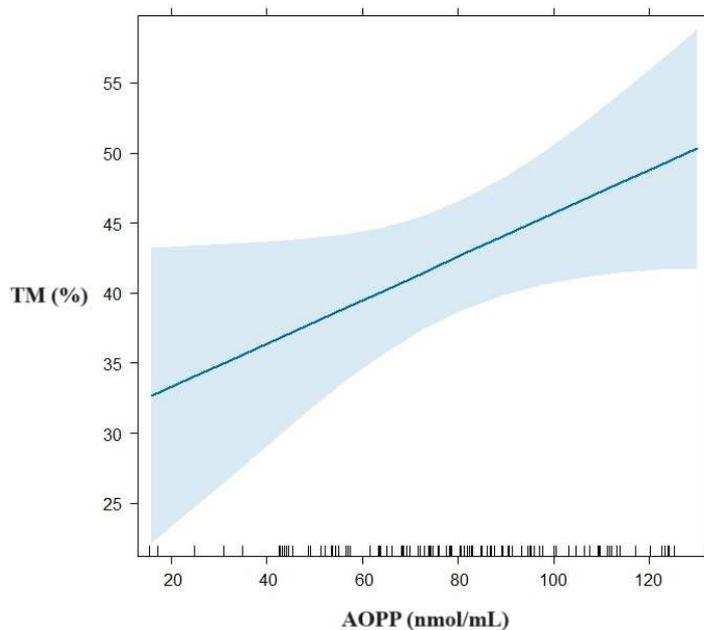


Figura 12. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile AOPP (nmol/mL) relacionada alla TM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

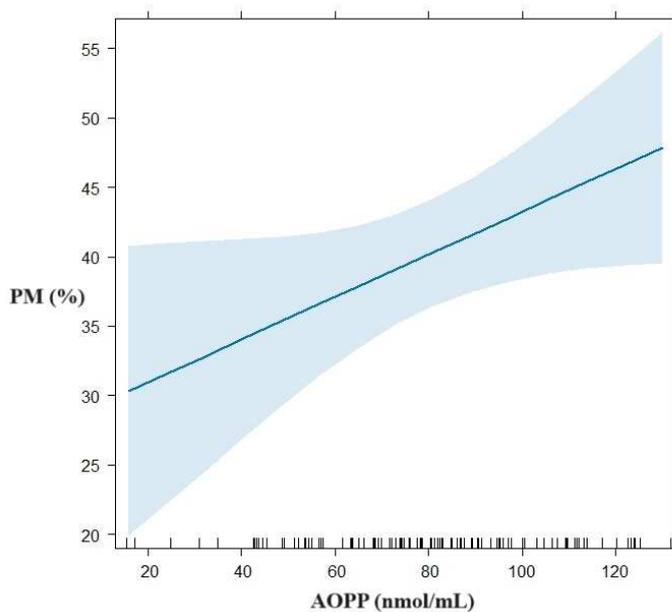


Figura 13. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile AOPP (nmol/mL) relacionada alla PM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

In merito alle relazioni dei Tioli si nota una relazione positiva con la concentrazione ($p < 0,05$).

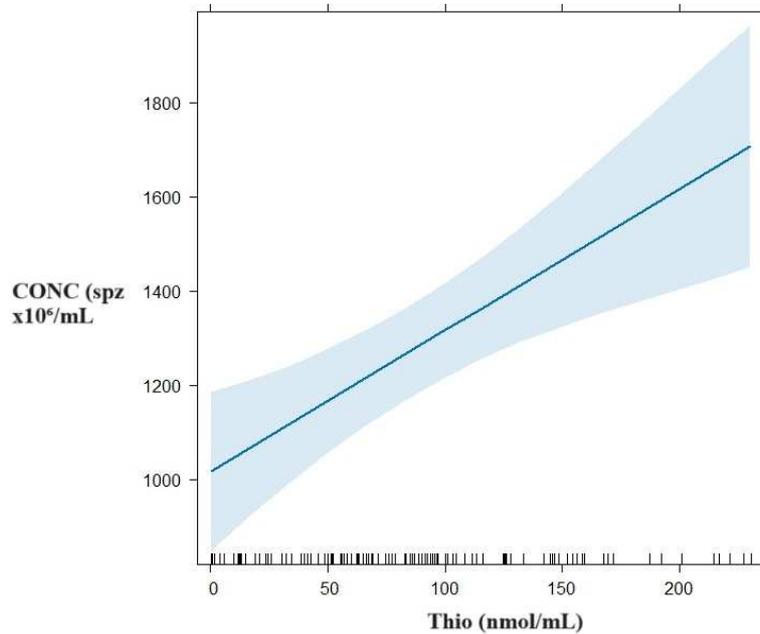


Figura 14. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile thio (nmol/mL) relazionata alla CONC (10⁶/mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

Il contenuto di TST (nmol/mL) ha dimostrato delle relazioni positive con la percentuale di anomalie minori ($p < 0,05$) e negative sia con percentuale di spermatozoi normali ($p < 0,05$) sia con la percentuale di spermatozoi vivi normali ($p < 0,05$).

Il coefficiente di variazione (CV) interassay è risultato pari a 18,76% mentre il CV intrassay è stato del 4,02%.

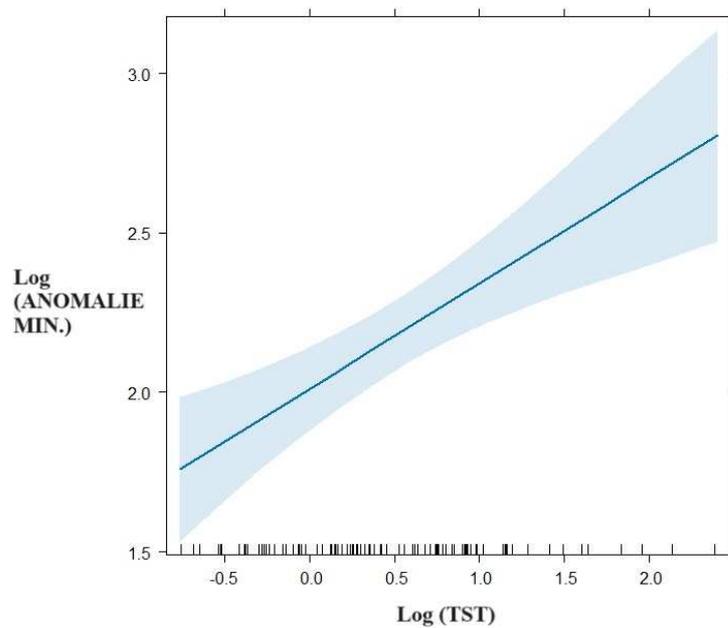


Figura 15. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile log. TST relazionata alla variabile log. ANOMALIE MIN. sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

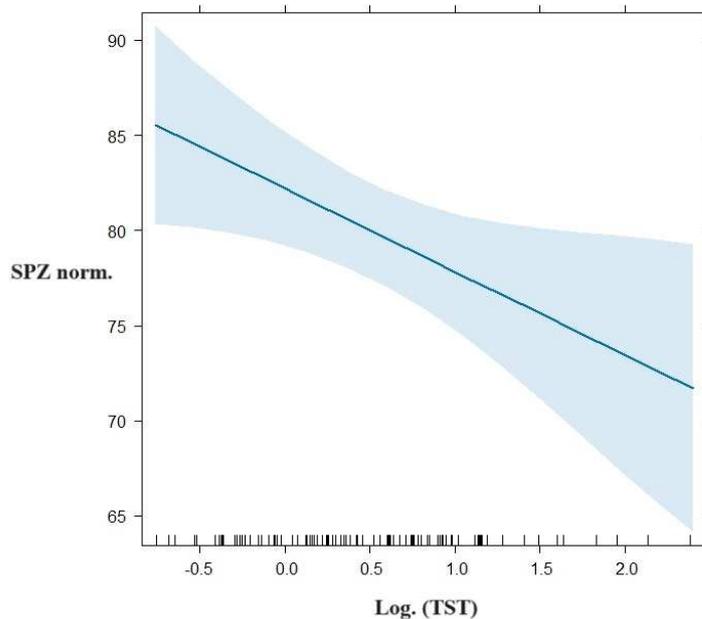


Figura 16. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile log. TST relazionata agli SPZ normali (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

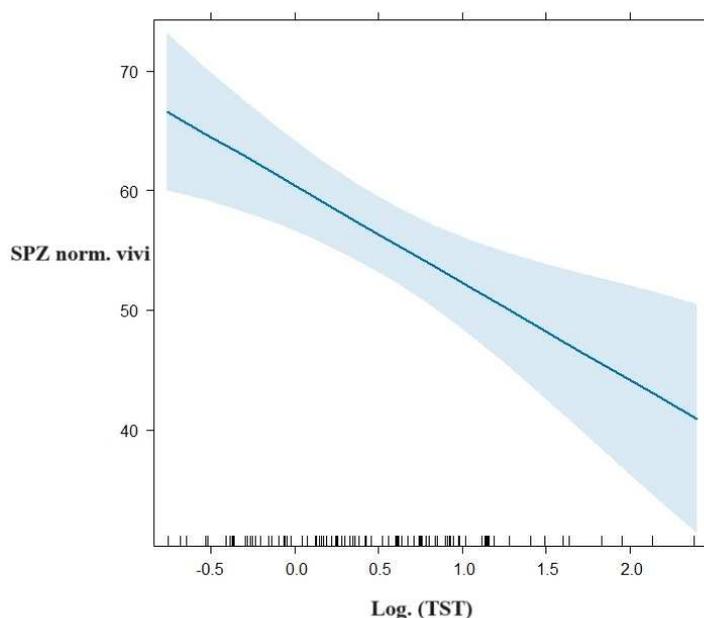


Figura 17. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile log. TST relazionata gli SPZ normali vivi (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 7. Indici dei modelli di regressione utilizzati

Variabile risposta	Variabile esplicativa	R2	RSE	Intercetta (IC 2.5-97.5%)	Pendenza (IC 2.5-97.5%)	P-value
Conc.	AOPP	0,10	484,80	771,649 (462,08 – 1081,21)	6,41 (2,73 – 10,09)	0,0008
TM	AOPP	0,04	20,10	30,19 (17,36 – 43,03)	0,15 (0,002 – 0,31)	0,0468
PM	AOPP	0,04	19,61	27,86 (15,18 – 40,56)	0,15 (0,003 – 0,304)	0,0451
Conc.	Thio	0,11	492,50	1015,75 (845,83 – 1185,68)	3,00 (1,35 – 4,66)	0,0005
Anomalie min.	TST	0,15	5,86	8,49 (7,07 – 9,92)	3,79 (2,00 – 5,57)	0,0001
SPZ norm.	TST	0,05	12,32	82,21 (79,21 – 85,21)	-4,38 (-8,12 – -0,64)	0,0220
SPZ norm. vivi	TST	0,10	15,55	60,43 (56,64 – 64,22)	-8,13 (-12,85 – -3,41)	0,0009

6.2. Variabili ambientali e parametri seminali

6.2.1. Statistica descrittiva sulle variabili ambientali

Dalle centraline meteo situate nel centro genetico sono stati ottenuti i dati di temperatura e umidità per il calcolo del THI ambientale. Nel periodo dal 08/12/2021 al 17/07/2022 non è stato possibile ricavare informazioni sulla temperatura-umidità per l'assenza delle centraline, ma tramite una retta di regressione sono stati stimati i THI sulla base dei THI della stazione meteo più vicina (Stazione di San Vito al Tagliamento).

Da un punto di vista descrittivo sono stati considerati i THI giornalieri dal 2021 al 2023:

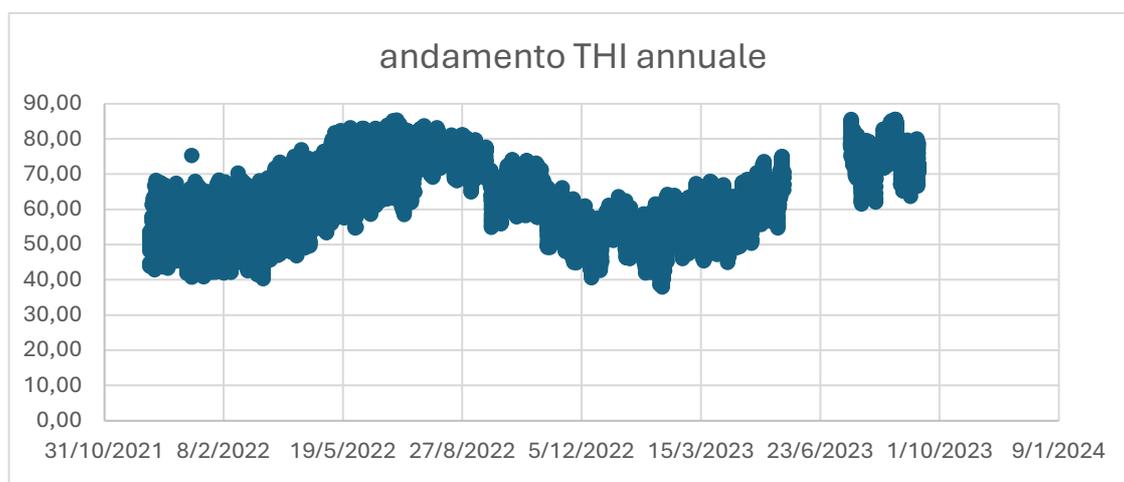


Grafico 1. Andamento annuale THI durante il periodo di raccolta del seme, in ascissa la data, in ordinata i valori di THI. Ogni punto rappresenta un valore orario di THI rilevato dalle centraline dal 08/12/2021 al 13/09/2023.

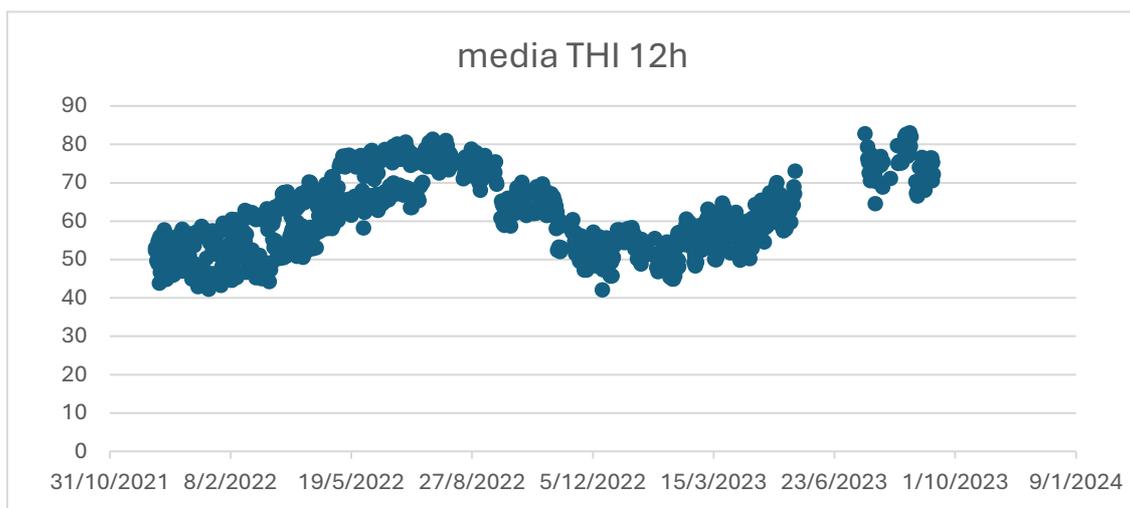


Grafico 2. Andamento annuale delle medie ogni 12h dei THI. Ogni punto rappresenta un valore medio di THI calcolato ogni 12h.

Viene inoltre considerato il delta THI notte-giorno: tale valore è calcolato sottraendo alla media del THI delle 12h notturne (dalle 20.00 alle 8.00), la media del THI delle 12h diurne precedenti.

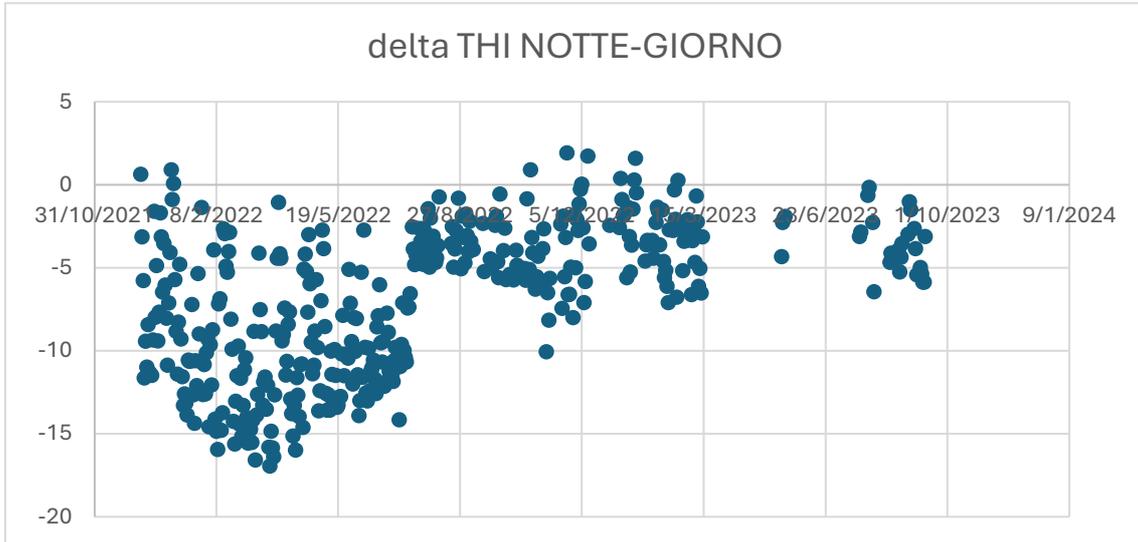


Grafico 3. Distribuzione dei delta THI notte/giorno. Delta negativi indicano THI maggiori di giorno rispetto alla notte in quel dato periodo. Come si nota dal grafico soprattutto nel periodo da febbraio a maggio si hanno escursioni tra notte e giorno molto importanti con THI inferiori a -15.

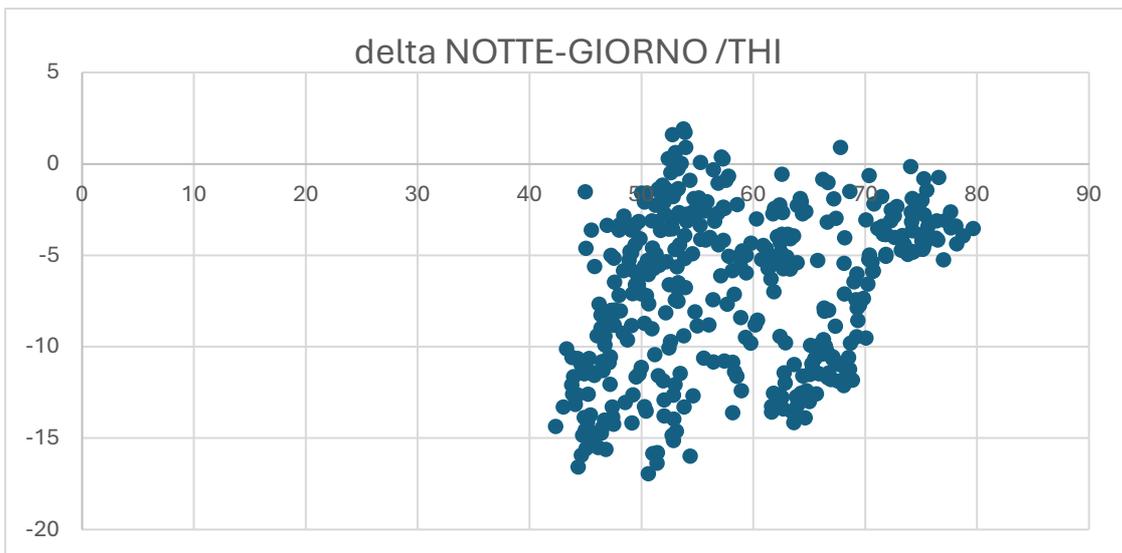


Grafico 4. Delta NOTTE-GIORNO rapportato al THI, con in ascissa i valori di THI, in ordinata i valori del delta.

6.2.2. Relazione tra parametri seminali e variabili ambientali

Applicando modelli di regressione lineare, sono state analizzate le relazioni tra la mediana del THI e diversi parametri seminali. In particolare, è stata considerata la mediana dei THI dei 60 giorni precedenti al momento del prelievo di seme, poiché la spermatogenesi dura circa 60 giorni e la mediana dei THI delle 24 ore precedenti al momento della raccolta. Si ritengono significative le associazioni con $p < 0,05$.

Inoltre, sono stata valutate le relazioni tra i parametri seminali e la mediana ottenuta dal DELTA notte-giorno dei 60 giorni precedenti al prelievo e delle 24h.

6.2.2.1. Relazione tra le variabili seminali e la mediana del THI dei 60 gg precedenti al prelievo

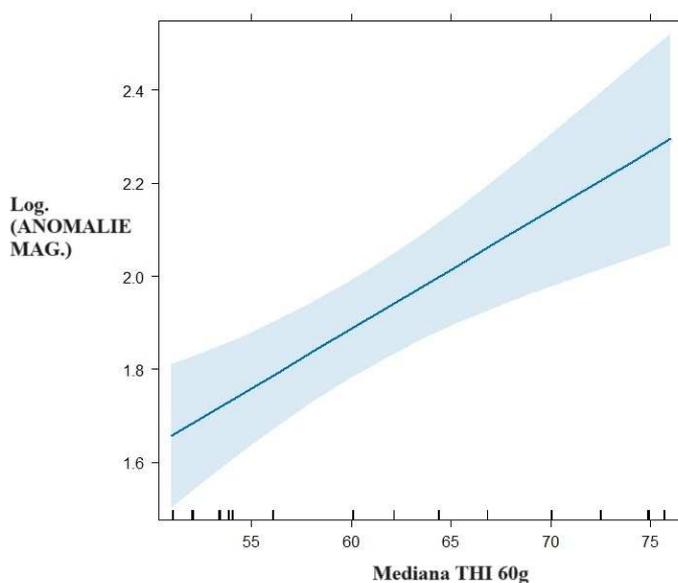


Figura 18. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relazionata alla variabile log. ANOMALIE MAG. sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

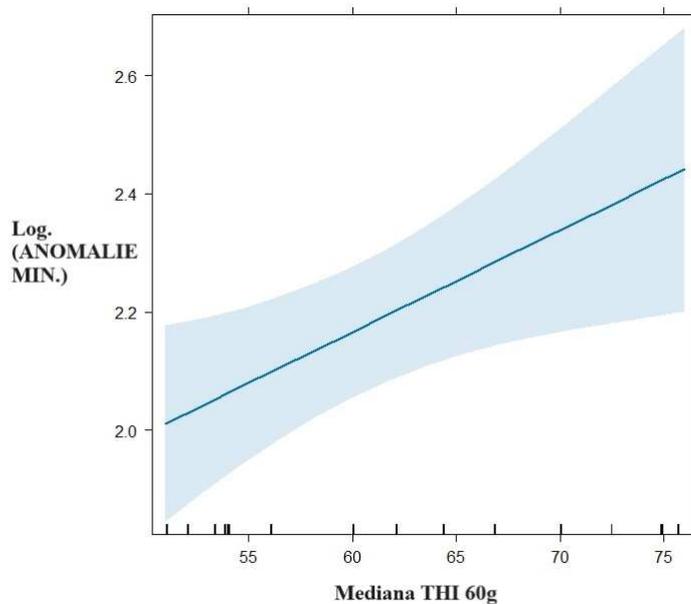


Figura 19. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relacionada alla variabile log. ANOMALIE MIN. sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

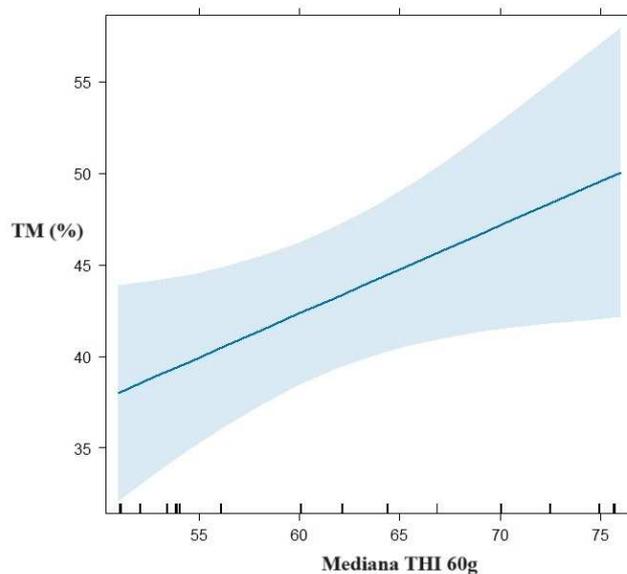


Figura 20. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relacionada a TM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

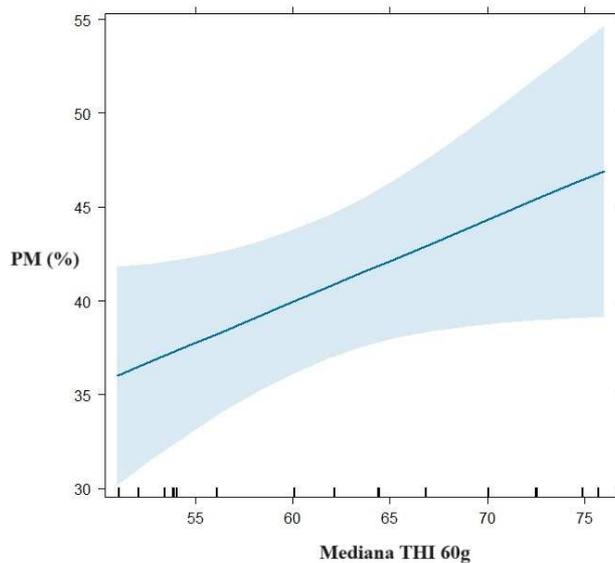


Figura 21. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relazionata a PM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

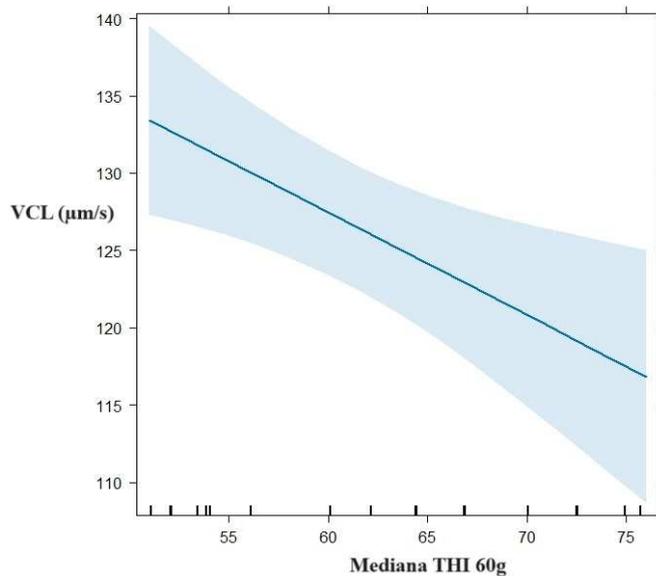


Figura 22. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relazionata a VCL ($\mu\text{m/s}$) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

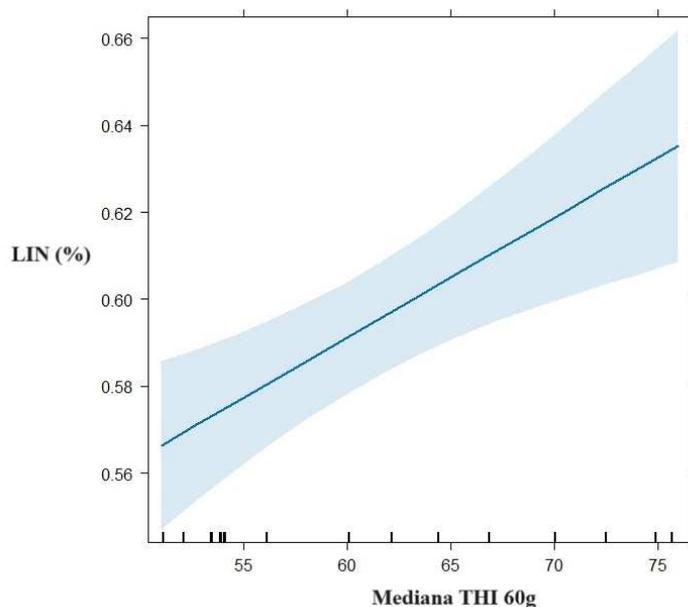


Figura 23. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relacionada a LIN (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

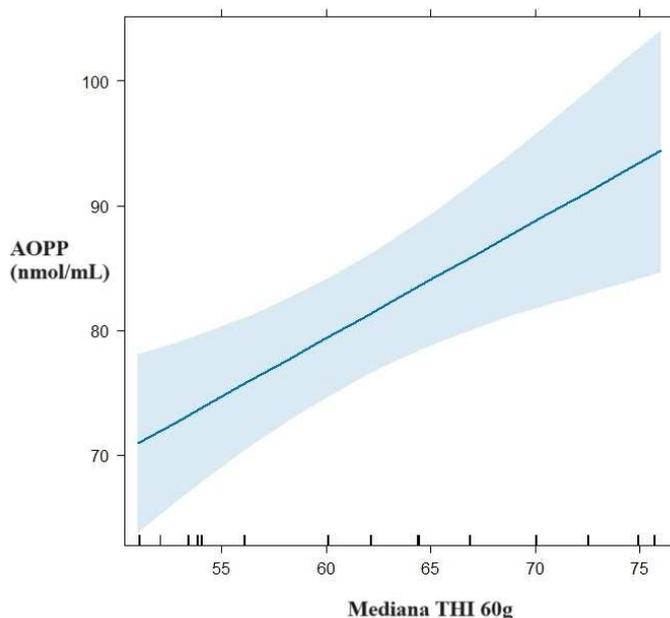


Figura 24. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 60g relacionada a AOPP (nmol/mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 8. Indice dei modelli di regressione utilizzati

Variabile risposta	Variabile esplicativa	R2	RSE	Intercetta (IC 2.5-97.5%)	Pendenza (IC 2.5-97.5%)	P-value
Anomalie mag.	Mediana THI 60g	0,12	0,53	1,12 (0,69 – 1,55)	0,01 (0,007 – 0,024)	0,0004
Anomalie min.	Mediana THI 60g	0,04	0,57	1,71 (1,26 – 2,17)	0,01 (0,0002 – 0,018)	0,0457
TM	Mediana THI 60g	0,06	20,29	22,52 (7,01 – 38,03)	0,40 (0,10 – 0,70)	0,0089
PM	Mediana THI 60g	0,05	19,85	21,87 (6,51 – 37,22)	0,36 (0,07 – 0,66)	0,0150
VCL	Mediana THI 60g	0,07	21,19	149,60 (133,40 – 165,80)	-0,45 (-0,76 – -0,14)	0,0050
LIN	Mediana THI 60g	0,12	0,07	0,50 (0,44 – 0,55)	0,002 (0,001 – 0,003)	0,0003
AOPP	Mediana THI 60g	0,13	23,92	43,89 (25,15 – 62,63)	0,72 (0,36 – 1,08)	0,0001

6.2.2.2. Relazioni tra le variabili seminali e la mediana del THI delle 24h precedenti al prelievo

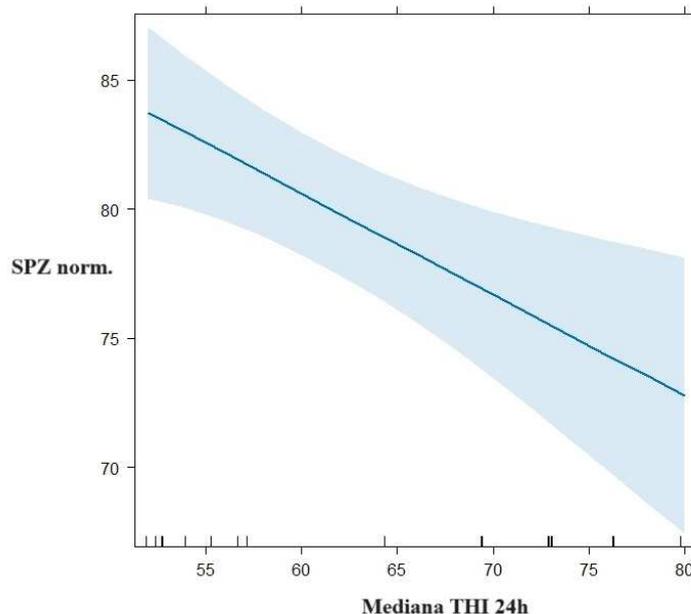


Figura 25. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 24h relazionata agli spz. normali (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

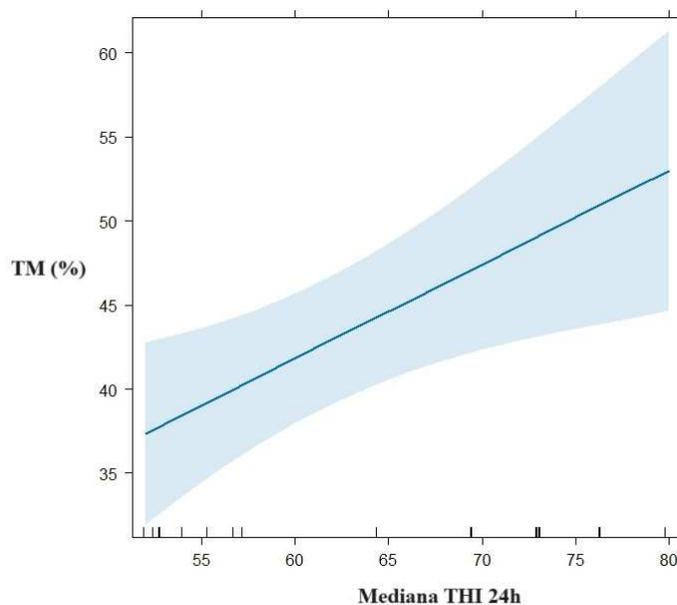


Figura 26. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 24h relazionata a TM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

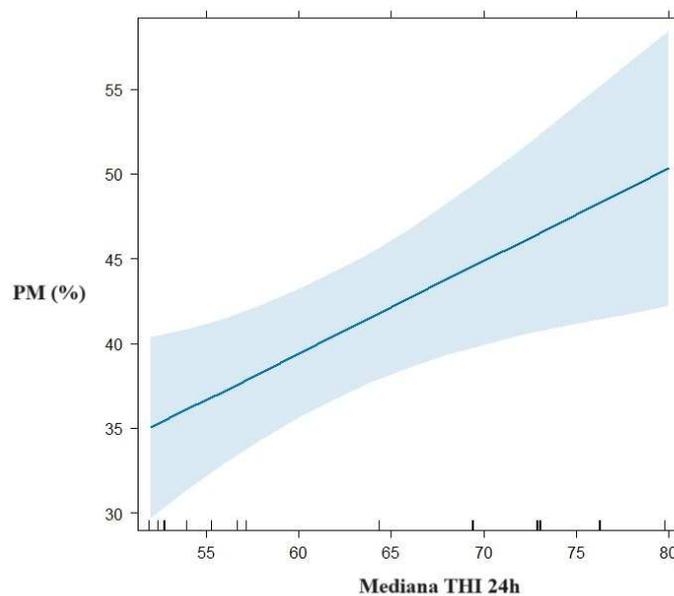


Figura 27. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 24h relazionata a PM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

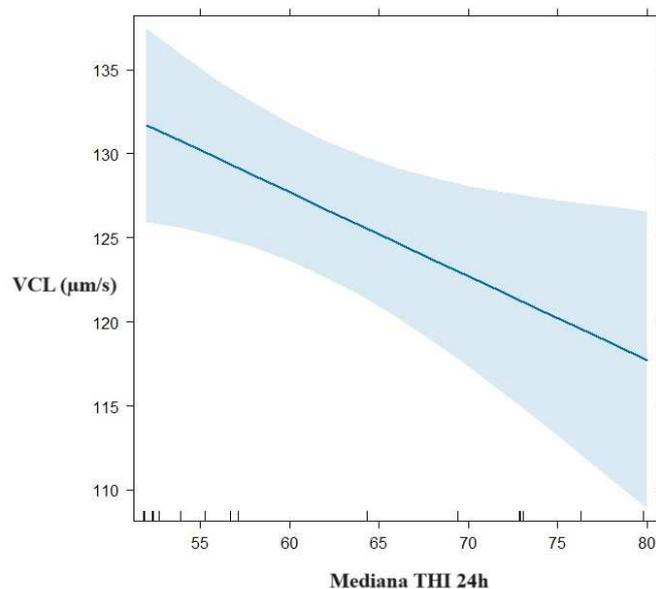


Figura 28. *Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 24h relacionada a VCL ($\mu\text{m/s}$) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.*

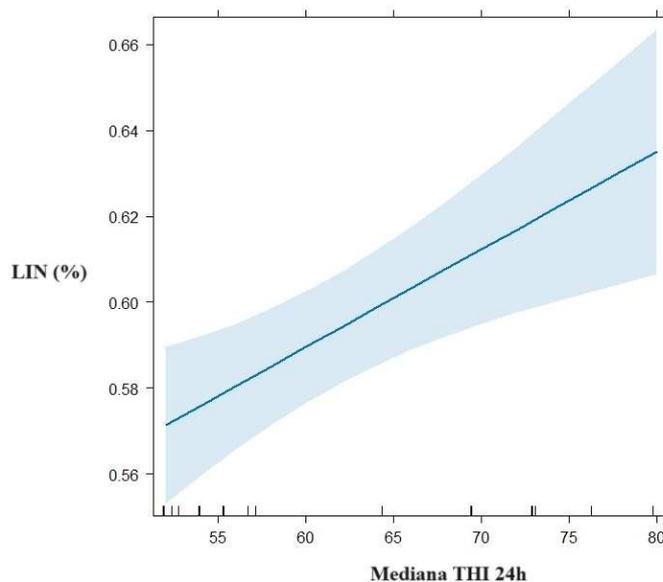


Figura 29. *Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 24h relacionada a LIN (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.*

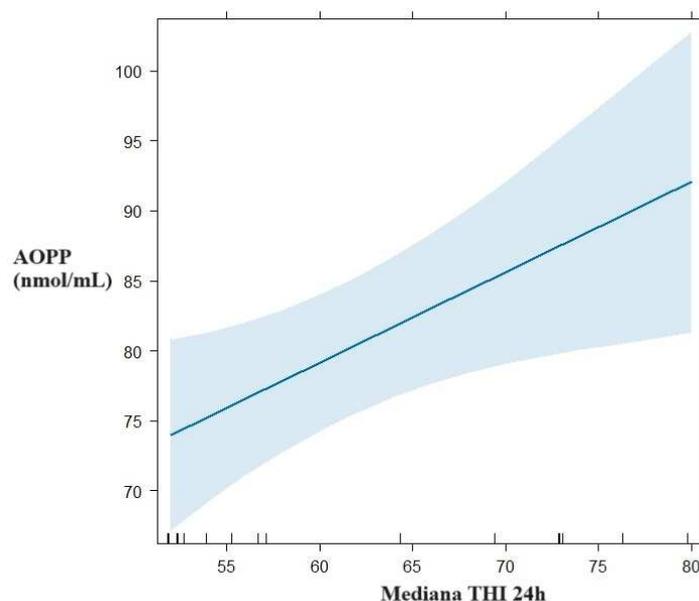


Figura 30. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana THI 24h relazionata a AOPP (nmol/mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 9. Indici dei modelli di regressione utilizzati

Variabile risposta	Variabile esplicativa	R2	RSE	Intercetta (IC 2.5-97.5%)	Pendenza (IC 2.5-97.5%)	P-value
SPZ norm.	Mediana THI 24h	0,08	12,03	94,16 (84,78 – 103,54)	-0,27 (-0,45 – -0,09)	0,0028
TM	Mediana THI 24h	0,83	20,05	19,79 (4,87 – 34,72)	0,44 (0,16 – 0,72)	0,0021
PM	Mediana THI 24h	0,09	19,49	17,32 (2,68 – 31,97)	0,44 (0,17 – 0,71)	0,0017
VCL	Mediana THI 24h	0,07	21,24	148,26 (132,45 – 164,07)	-0,41 (-0,70 – -0,12)	0,0067
LIN	Mediana THI 24h	0,12	0,07	0,50 (0,45 – 0,55)	0,002 (0,001 – 0,003)	0,0002
AOPP	Mediana THI 24h	0,07	24,71	53,32 (34,03 – 72,60)	0,52 (0,15 – 0,88)	0,0055

6.2.2.3. Relazione tra le variabili seminali e la mediana del delta THI notte-giorno dei 60 giorni precedenti al prelievo

È stata considerata la mediana del delta notte-giorno dei THI relativi ai 60 giorni precedenti al momento di raccolta del seme. Dai risultati è emerso che, quando la variazione di THI tra la notte e il giorno aumenta, vi è una riduzione della concentrazione di AOPP nel plasma seminale e un aumento di ALH.

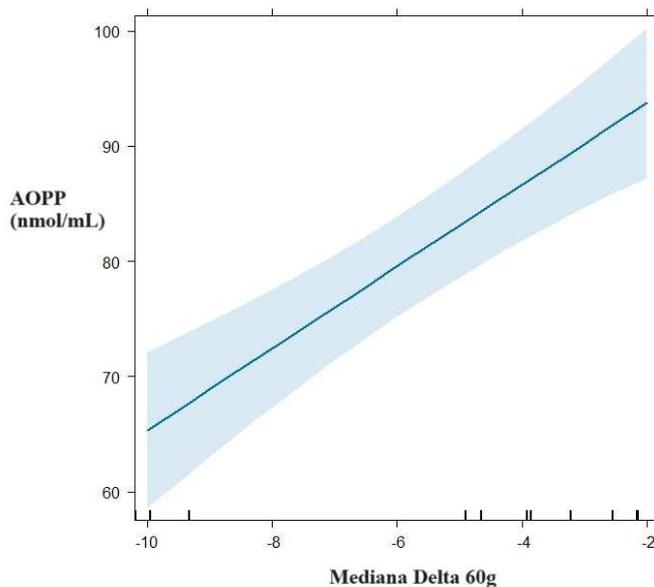


Figura 31. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 60g relazionata alle AOPP (nmol/mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

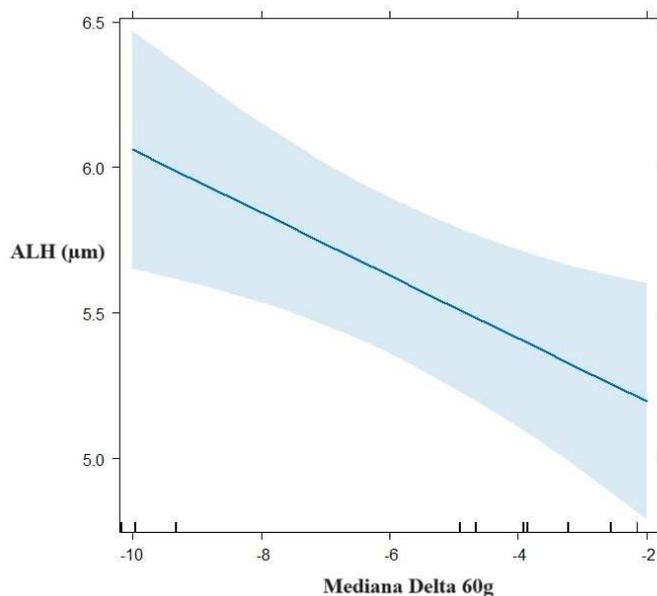


Figura 32. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 60g relacionada a ALH (μm) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 10. Indici dei modelli di regressione utilizzati

Variabile risposta	Variabile esplicativa	R2	RSE	Intercetta (IC 2.5-97.5%)	Pendenza (IC 2.5-97.5%)	P-value
AOPP	Mediana Delta 60g	0,25	21,8 5	103,17 (94,20 – 112,14)	4,14 (2,73 – 5,55)	0,000 0
ALH	Mediana Delta 60g	0,05	0,82	5,08 (4,74 –5,41)	-0,06 (-0,11 – -0,01)	0,024 7

6.2.2.4. Relazione tra le variabili seminali e la mediana del delta THI notte-giorno delle 24h precedenti al prelievo

Infine, considerando la mediana relativa al delta notte-giorno del THI delle 24h precedenti alla raccolta, si osserva che, quando la variazione di THI tra la notte e il giorno precedenti al prelievo è più elevata, si ha una riduzione delle anomalie maggiori, della TM, della PM e della concentrazione di AOPP nel PS, mentre si ha un aumento del volume.

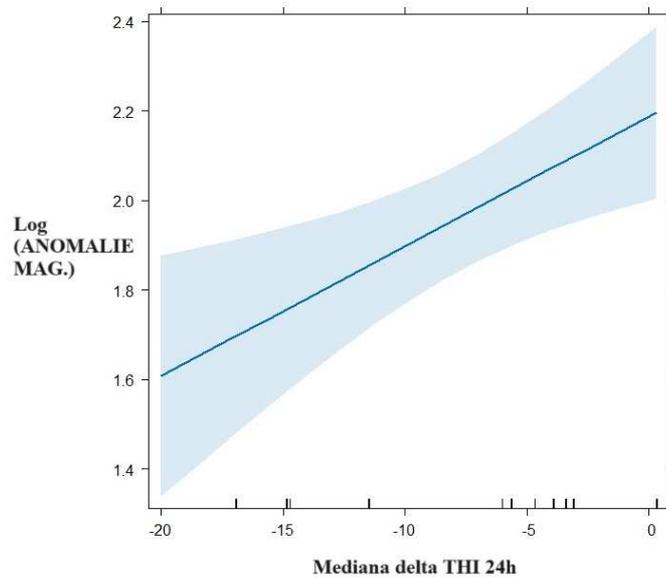


Figura 33. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 24h relazionata alla variabile log. anomalie maggiori sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

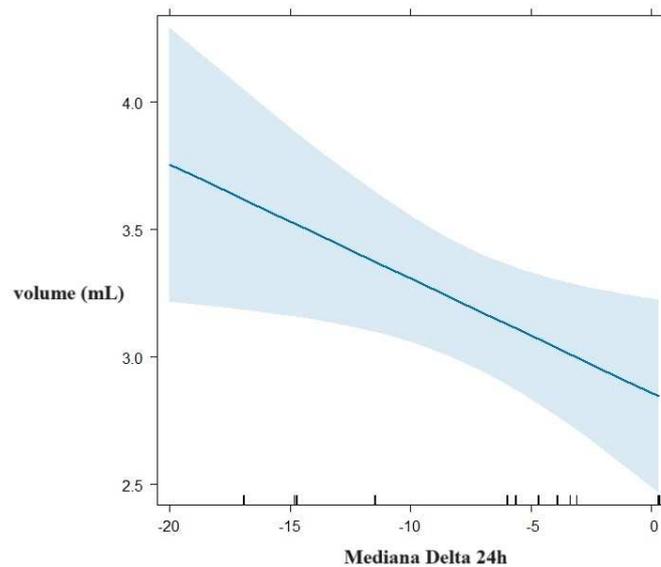


Figura 34. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 24h relazionata al volume (mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

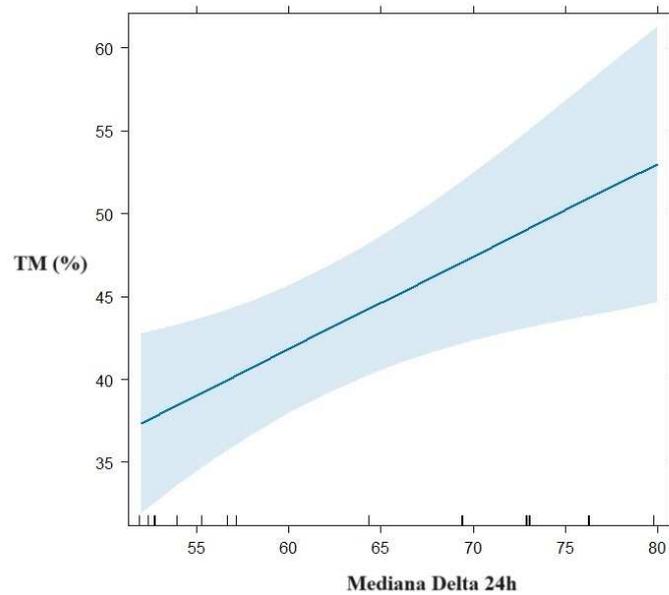


Figura 35. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 24h relacionada a TM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

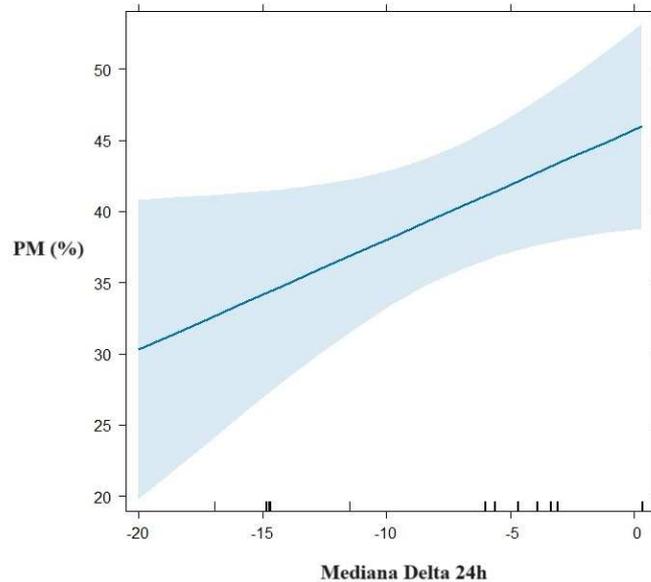


Figura 36. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 24h relacionada a PM (%) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione positiva tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

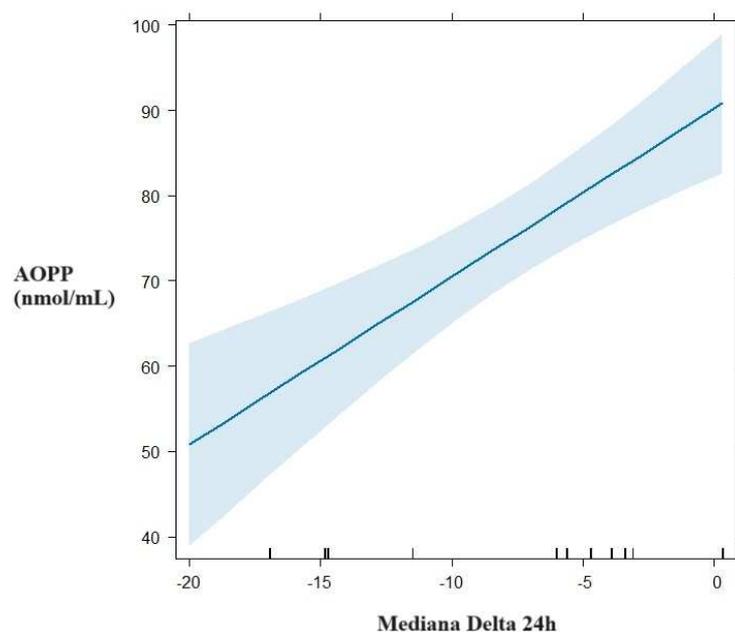


Figura 37. Sull'asse delle ascisse si trova la variabile mediana delta THI 24h relazionata alle AOPP (nmol/mL) sull'asse delle ordinate. La retta di regressione ottenuta dal modello mostra una relazione negativa tra le due variabili. L'area azzurra descrive l'intervallo di confidenza al 95%.

Tabella 11. Indici dei modelli di regressione utilizzati

Variabile risposta	Variabile esplicativa	R2	RSE	Intercetta (IC 2.5-97.5%)	Pendenza (IC 2.5-97.5%)	P-value
Volume	Mediana Delta 24h	0,05	1,09	2,87 (2,53 – 3,21)	-0,04 (-0,08 – -0,01)	0,0230
Anomalie mag.	Mediana Delta 24h	0,04	0,57	2,05 (1,86 – 2,23)	0,02 (0,00 – 0,04)	0,0492
TM	Mediana Delta 24h	0,04	20,83	48,29 (41,81 – 54,76)	0,82 (0,07 – 1,57)	0,0312
PM	Mediana Delta 24h	0,04	20,35	45,57 (39,23 – 51,90)	0,78 (0,04 – 1,52)	0,0381
AOPP	Mediana Delta 24h	1,23	22,25	93,32 (86,31 – 100,33)	2,21 (1,40 – 3,02)	0,0000

6.3. Risultati AOPP e Di-tirosina

Considerando le relazioni emerse tra le AOPP e i principali parametri seminali (concentrazione, motilità totale e progressiva) e con tutte le variabili ambientali in esame, è stato approfondito lo studio sul plasma seminale tramite analisi Western Blot (WB) e di spettrofotometria.

I campioni sono stati analizzati allo spettrofotometro con intensità di fluorescenza per determinare le concentrazioni di DT. Successivamente è stata valutata qualitativamente la distribuzione della DT tramite WB a diversi pesi molecolari (PM). Sono stati selezionati 24 campioni suddivisi in due gel (1A; 1B), in ogni gel 6 campioni presentavano concentrazioni di AOPP alte e 6 campioni concentrazioni di AOPP basse.

6.3.1. Analisi spettrofotometrica della DT

Con la spettrofotometria a fluorescenza è stata valutata la concentrazione della DT per campione. Vengono presi in considerazione i 24 campioni selezionati per il successivo WB.

Non sono risultate correlazioni significative tra la DT e la concentrazione di AOPP nel PS.

6.3.2. Western Blotting

Dalle analisi WB è possibile evidenziare la distribuzione delle DT nei diversi campioni e nelle proteine a diversi PM.

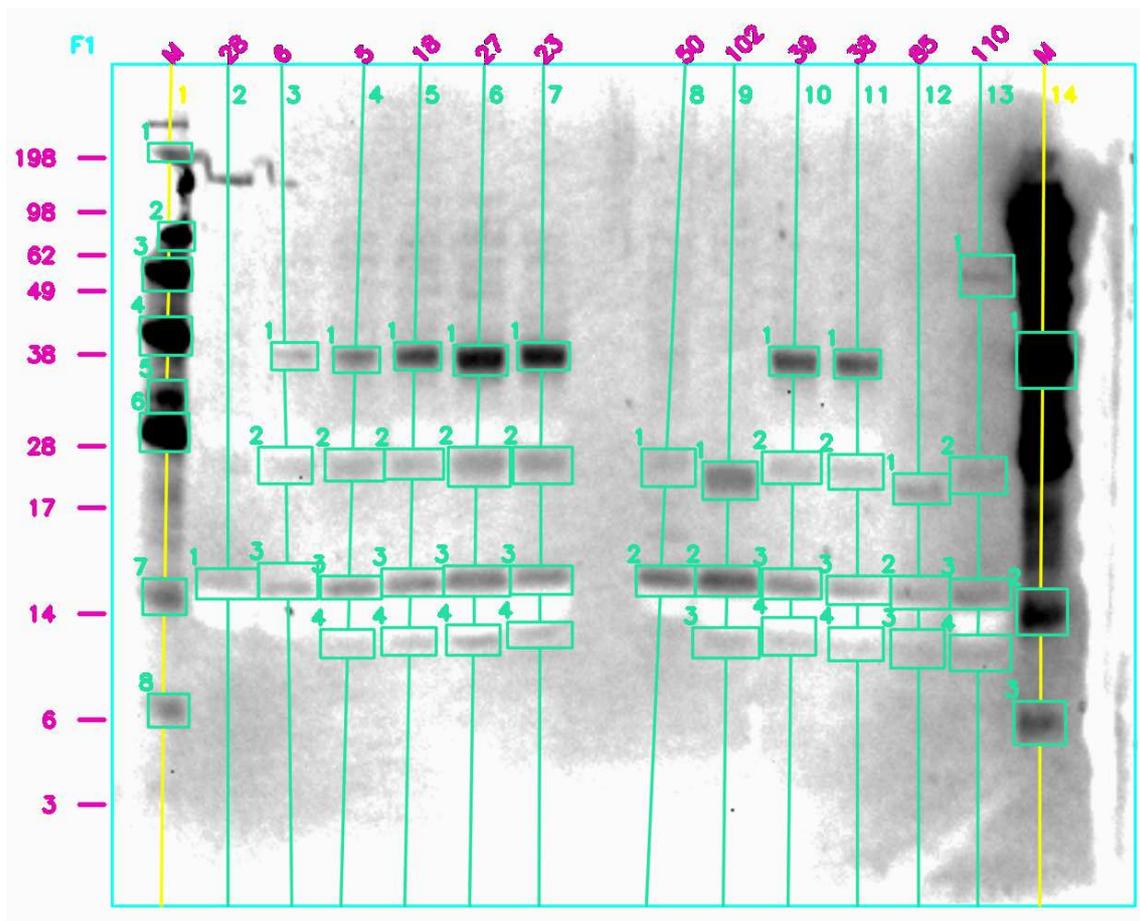


Figura 38. WB 1A. Campioni 28, 6, 5, 18, 27, 23 con AOPP basse; campioni 50, 102, 39, 38, 85, 110 con AOPP alte; M identifica i marker. Lateralmente sono segnati i PM da 196 kDa a 3 kDa.

Le bande verdi evidenziano a quale PM si trovano le DT.

È possibile riconoscere la presenza delle DT principalmente ai PM medi di 11 kDa, 14,5 kDa, 23 kDa, 36 kDa.

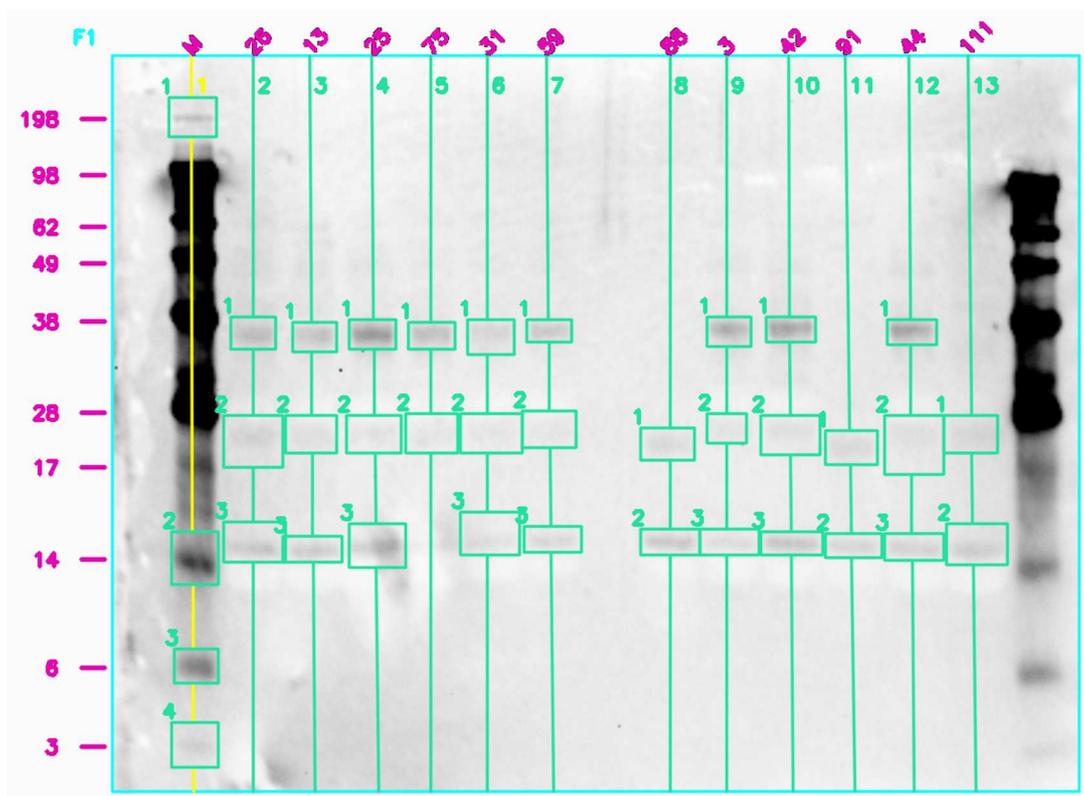


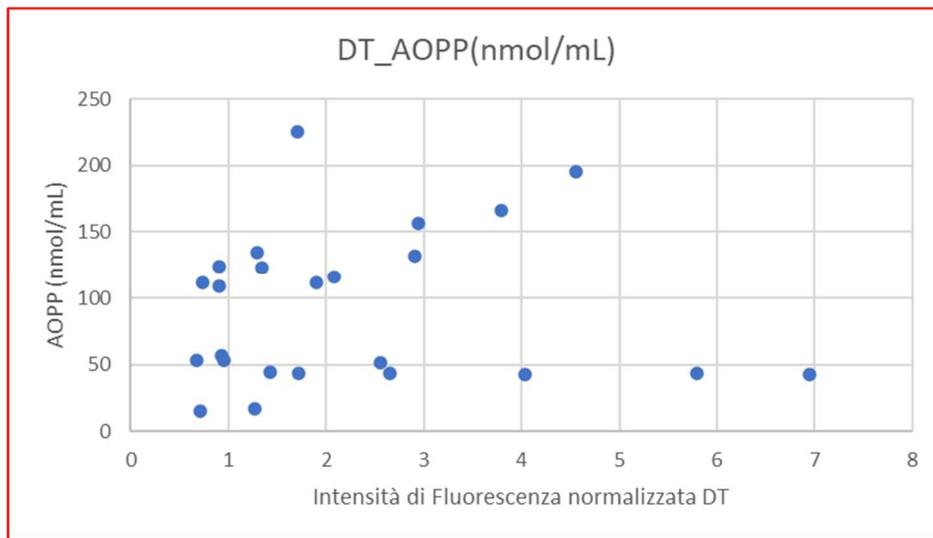
Figura 39. WB 1B. Campioni 26, 13, 25, 75, 31, 59 con AOPP basse; campioni 88, 3, 42, 91, 44, 111 con AOPP alte. M identifica i marker. Lateralmente sono segnati i PM da 196 kDa a 3 kDa.

Le bande verdi evidenziano a quale PM si trovano le DT.

È possibile riconoscere la presenza delle DT principalmente ai PM medi di 14,5 kDa, 22,5 kDa, 36 kDa, 47 kDa

L'intensità di fluorescenza di ciascuna banda è stata messa in relazione con le concentrazioni di AOPP del PS. I dati sono stati analizzati singolarmente (WB A; WB B) e poi integrati normalizzando l'intensità di fluorescenza delle bande con l'intensità di fluorescenza del marker a 14 kDa di ciascun WB. Nelle figure 40-A e 40-B viene riportata in ascissa l'intensità di fluorescenza della DT di ciascun campione, ottenuta sommando le intensità di fluorescenza di tutte le bande visibili di DT per quel determinato campione, normalizzate per il marker. In ordinata si trova la concentrazione di AOPP (nmol/mL) del PS dei vari campioni analizzati. Dal grafico si deduce che, quando il contenuto di AOPP nel PS è al di sopra di 100 nmol/mL, vi è un aumento significativo del contenuto di DT nelle proteine del PS. Questa relazione viene dimostrata nella figura 40B in cui sono stati tolti i campioni con AOPP < 100 nmol/mL.

A)



B)

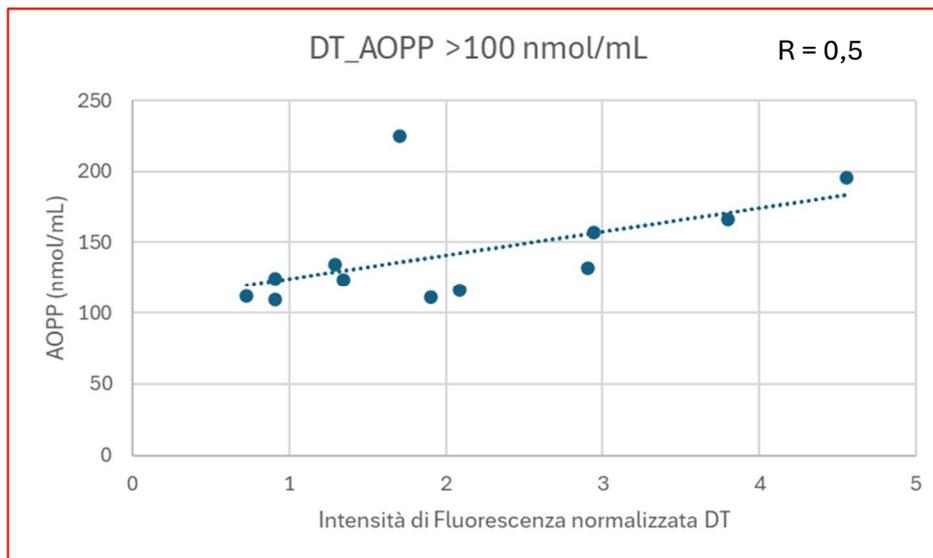


Figura 40-A. Relazione tra il contenuto di DT e di AOPP nel PS. In ascissa l'intensità di fluorescenza della DT, in ordinata le concentrazioni di AOPP (nmol/mL) per ciascun campione analizzato tramite WB (n=24). Si evidenzia la presenza di DT principalmente oltre 100 nmol/mL,

Figura 40-B. Relazione tra il contenuto di DT e di AOPP nel PS. In ascissa l'intensità di fluorescenza della DT, in ordinata le concentrazioni di AOPP (nmol/mL) per i campioni con AOPP > 100 nmol/mL (n=12).

Considerando i campioni con contenuto di AOPP > 100 nmol/mL, nelle bande a determinati PM (11kDa, 14.5 kDa e 36 kDa) all'aumentare del contenuto di DT (aumento dell'intensità di fluorescenza) corrisponde un aumento di AOPP nel PS (figure 41, 42, 43)

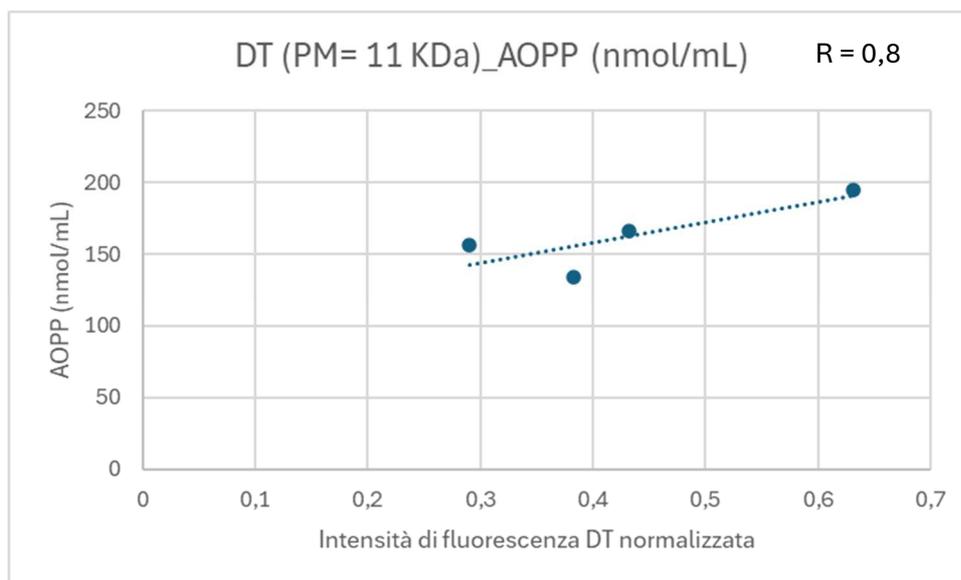


Figura 41. Relazione tra l'intensità di fluorescenza della DT al PM 11,5 kD e la concentrazione di AOPP nel PS (n=4).

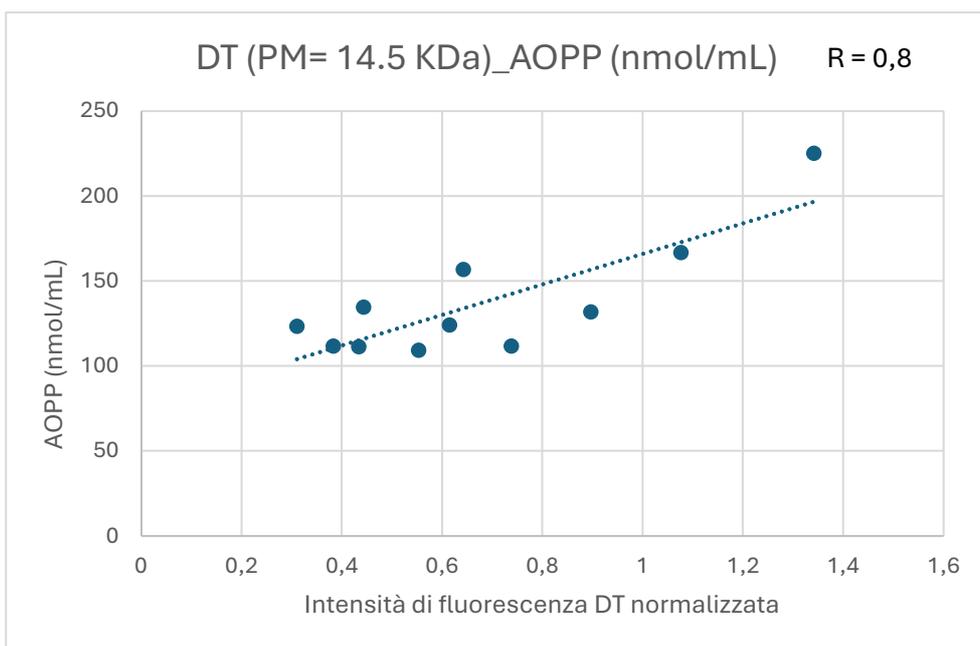


Figura 42. Relazione tra l'intensità di fluorescenza della DT al PM 14.5 kDa e la concentrazione di AOPP nel PS (n=11).

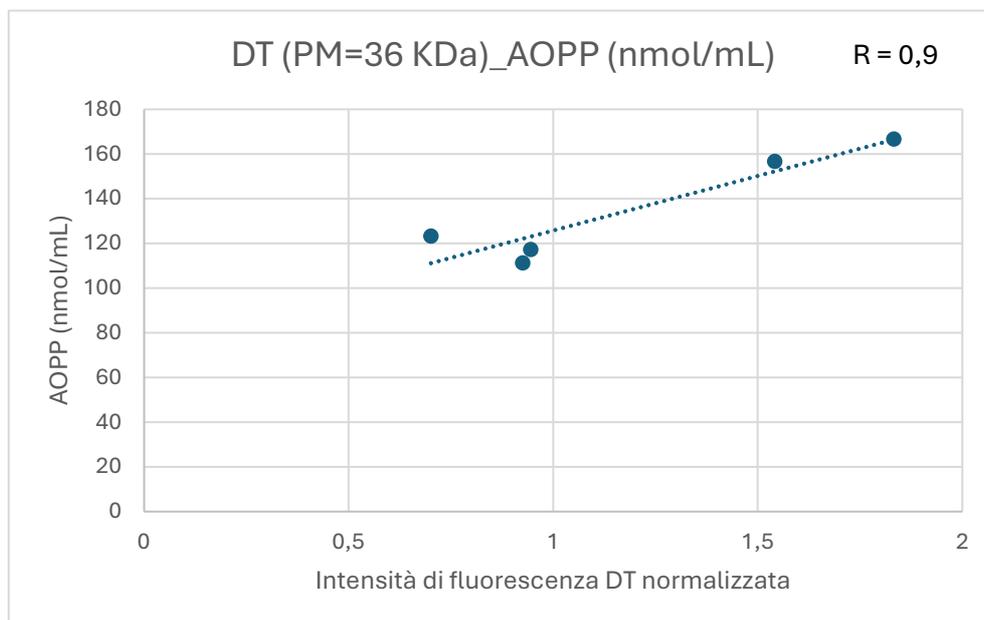


Figura 43. Relazione tra l'intensità di fluorescenza della DT al PM 36 kDa e la concentrazione di AOPP nel PS (n=5).

7. DISCUSSIONE

7.1. Relazione tra i parametri del seme e del plasma seminale

Prendendo in esame i parametri seminali, la concentrazione stimata presenta un'ampia variabilità, tra $742,15 \times 10^6/\text{mL}$ e $1779,11 \times 10^6/\text{mL}$, in linea con le concentrazioni valutate in altri articoli (Kapš et al., 2000; Isnaini et al., 2019; Satrio et al., 2022). Mentre per il volume ($3,21 \pm 1,13 \text{ mL}$), il valore medio osservato è inferiore rispetto ad altri risultati in letteratura. Nell'articolo di Filipčík et al. (2023), dove si esamina nello specifico la razza Simmental, si registrano volumi maggiori; $7,52 \text{ mL}$ in animali a 1 anno e mezzo di età e $9,73 \text{ mL}$ in animali a 2 anni di età. In altri studi precedenti (Biniová et al., 2017) il volume si mantiene su valori comparabili ($8.88 \pm 3.32 \text{ ml}$) in animali sessualmente maturi. Sempre dallo studio di Satrio et al. (2022) si dimostra che il volume tende ad aumentare fino ai 4 anni di età, quando si registra il picco massimo, dopodiché si ha un incremento del tasso di scarto (rejection rate). Si tenga conto che, in questa ricerca, vengono studiati animali di circa 12-13 mesi d'età, in performance test, non ancora completamente addestrati. Infatti, oltre a volumi minori, sono state osservate anche motilità ridotte. La TM (%) presenta un'alta variabilità: tra 21,90% e 63,58%, e per PM (%) si registrano valori variabili tra 20,04% e 60,64%. I risultati sono compatibili con lo studio di Pause Corte et al. (2022), svolto sempre presso l'azienda Ricchieri, dove in media la PM risultava essere di 42,9%.

Per quanto riguarda la morfologia, $1'80,12 \pm 12,50\%$ degli spermatozoi analizzati risulta normale, di cui il $56,14 \pm 16,74\%$ normali vivi. Le anomalie maggiori presentano una variabilità tra 3,05% e 12,37%, mentre le anomalie minori tra 3,97% e 16,59%. Ma la somma delle anomalie si attesta al di sotto del limite massimo del 30% quindi definite accettabili (Johnson et al., 1994).

In merito invece ai parametri relativi allo stress ossidativo, confrontiamo i valori ottenuti con lo studio di Vigolo et al. (2022): i valori di tioli ($84,96 \pm 57,56 \text{ nmol/mL}$) e CT ($3,96 \pm 1,15 \text{ nmol/mL}$) si rivelano più bassi rispetto allo studio in esame, mentre le AOPP ($80,03 \pm 25,52 \text{ nmol/mL}$) si mantengono confrontabili. I gruppi carbonili si formano precocemente relativamente all'inizio dell'esposizione allo stress ossidativo, e sono molto stabili, risultando un valido marker di danno ossidativo delle proteine (Mostek et al., 2017). Analizzando le relazioni tra gli indicatori di stress ossidativo e i parametri di

qualità seminale sono emerse importanti considerazioni sulle AOPP: sia la TM che la PM presentano una relazione positiva con le AOPP del PS, e inoltre, all'aumento della concentrazione di AOPP nel PS risulta un aumento della concentrazione degli spermatozoi dell'eiaculato. Il fatto che la motilità sia influenzata dalle AOPP è confermato anche da Vigolo et al. (2022). L'aumento della TM e della PM potrebbe dipendere da un aumento dell'attività mitocondriale e quindi da un incremento nella produzione di ROS, che va a determinare una maggior ossidazione delle proteine del PS. È stato inoltre notato che la concentrazione di tioli nel PS è associata positivamente alla concentrazione spermatica mentre all'aumentare di TST nel PS vi è un aumento delle anomalie spermatiche minori degli spermatozoi e una riduzione significativa degli spermatozoi vitali e morfologicamente normali. Il TST agisce nel processo di spermatogenesi e maturazione spermatica (Staub & Johnson, 2018) ed è possibile che, in questo modo, aumenti l'incidenza di anomalie. L'assenza di tale ormone non potrebbe permettere il completamento della spermatogenesi. Tuttavia, non sono le cellule germinali a presentare i recettori per gli androgeni (AR), ma le cellule del Sertoli, del Leydig, vascolari e muscolari. Queste cellule permettono la maturazione degli spermatozoi producendo molecole sotto stimolazione del TST (O'Hara & Smith, 2015), e le cellule del Sertoli in particolare agiscono nella maturazione delle cellule germinali (Walker, 2010). La produzione e la secrezione di molecole è regolata diversamente in base al tratto considerato, per esempio a livello di epididimo il controllo è mediato dal TST quindi si ha un'azione diretta di tale ormone sullo sviluppo spermatico (Toshimori, 2003).

7.2. Effetti delle variabili ambientali sui parametri seminali

Per quanto riguarda la statistica descrittiva, i valori di THI annuali variano da un minimo di 38,08 e un massimo di 85,63. Dai grafici 1-2 (capitolo 6.2.1.) si evidenziano THI particolarmente alti in periodi estivi (maggio-agosto-settembre) rispetto al periodo invernale. Molti studi attestano come certi periodi dell'anno, soprattutto l'estate, influenzino maggiormente la qualità seminale (Nichi et al., 2006; Koonjaenak et al., 2007; Fiaz et al., 2010). Per quanto riguarda gli effetti dello stress da caldo, in bibliografia è riportato che l'aumento di THI induce un incremento del metabolismo testicolare con conseguente crescita del fabbisogno di ossigeno. Nonostante ciò, il flusso sanguigno non

raggiunge un aumento sufficiente e questo induce ipossia testicolare con conseguenze in merito alla morfologia degli spermatozoi (probabile aumento di anomalie) e alla motilità (Rahman et al., 2018).

Nei nostri studi è stata messa in relazione la mediana del THI dei 60 giorni precedenti all'eiaculazione e la mediana del THI delle 24h precedenti, per studiare il periodo di spermatogenesi e il momento appena precedente alla raccolta. È infatti risaputo che, non solo le variabili del giorno della raccolta, ma anche l'intervallo tra il reclutamento degli spermatogoni e la maturazione in spermatozoi maturi influenzano la produzione di seme (Fuerst-Waltl et al., 2006). Dai nostri risultati si osserva che all'aumentare della mediana THI 60g si ha un aumento delle anomalie morfologiche maggiori e minori degli spermatozoi, come già definito anche in altri studi (Gonçalves et al., 2021). Vi è inoltre anche una relazione positiva tra la mediana del THI 60g e i parametri di TM, PM e LIN del seme e le AOPP del PS. Il fatto che la motilità si mantenga nonostante l'aumento di THI è un dato interessante. Anche in altri studi si era notato che in estate vi è un aumento della TM e della morfologia normale del seme fresco di giovani tori, seppur con diminuzioni post congelamento (Pause Corte et al., 2022; Llamas-Luceño et al., 2020). Confrontando invece la mediana THI delle 24h precedenti con i parametri seminali, si mantiene la relazione positiva con TM, PM, LIN e AOPP coerentemente con i risultati precedenti. All'aumentare della mediana del THI 24h si ha una riduzione della percentuale di spermatozoi normali, ciò è dimostrato anche da altri studi che confermano un aumento nella produzione di spermatozoi morti in relazione all'incremento del THI (M. Sharma, 2018).

Da questi risultati è possibile desumere che sia il THI 60g sia il THI 24h presentano relazioni con i parametri di motilità principali (TM, PM, LIN) e con la concentrazione di AOPP. Nonostante ciò, il THI 60g condiziona in modo più rilevante lo sviluppo di anomalie spermatiche maggiori e minori (figura 44) rispetto al THI 24h. Il periodo di gametogenesi ha un'influenza significativa sulla morfologia degli spermatozoi mentre i parametri ambientali delle 24h precedenti alla raccolta sono associati alla riduzione della concentrazione di spermatozoi normali.



Figura 44. Riassunto delle relazioni positive e negative del THI 60g e del THI 24h.

È stato poi preso in considerazione la differenza di THI tra la notte e il giorno sia dei 60 giorni precedenti alla raccolta (delta THI 60g), sia delle 24h (delta THI 24h). Dal grafico 3 (capitolo 6.2.1.) si evidenzia che vi sono principalmente delta negativi, indicativi di THI diurni maggiori rispetto a THI notturni. All'aumentare della differenza di THI tra notte e giorno nei 60g precedenti al prelievo corrisponde un aumento dell'ALH e una riduzione della concentrazione di AOPP. Mentre la variazione di THI nelle 24h precedenti al salto influenza diversamente i parametri seminali: il volume e la morfologia migliorano quando il delta aumenta, mentre AOPP, TM, PM aumentano quando il delta si riduce. Di conseguenza si ipotizza che vi sia un'azione maggiore nell'immediato pre-eiaculatorio sulla motilità e sulla concentrazione di AOPP rispetto all'intero periodo di spermatogenesi. Inoltre, quando si ha una maggior escursione tra giorno e notte, si registrano riduzioni degli effetti dello stress da caldo.

7.3. AOPP e Di-tirosina

Considerando le relazioni significative delle AOPP con i principali parametri seminali (concentrazione, motilità totale e progressiva) e con tutte le variabili ambientali, sono state approfondite le analisi relative a tali prodotti. Nel nostro studio è emersa soprattutto la loro relazione positiva con la motilità spermatica.

Come già descritto, le AOPP sono considerate generalmente dei biomarcatori di danno ossidativo nei confronti delle proteine. Tuttavia, si tratta di un biomarcatore molto eterogeneo, in quanto formato da differenti alterazioni della struttura delle proteine. Le AOPP contengono carbonili, composti clorinati originati dall'azione dei neutrofili, prodotti finali della glicazione avanzata (AGE-HAS) e residui di di-tirosina (Bordignon et al., 2014; Celi & Gabai, 2015). L'aumento della loro concentrazione nel plasma sanguigno è considerato un indicatore di stress ossidativo legato a processi infiammatori

dovuti all'attivazione dei granulociti neutrofili (Witko-Sarsat et al., 1996; Witko-Sarsat et al., 1998; Selmecci, 2011).

Si è ritenuto, quindi, di provare a identificare quali componenti delle AOPP siano responsabili delle relazioni osservate in questo studio. Poiché gli animali in esame erano clinicamente sani e, soprattutto, non avevano segni di traumi o processi infiammatori in atto a livello testicolare, si è considerato improbabile che sia stata la componente derivante dall'azione della mieloperossidasi (legati all'attivazione dei neutrofili) (Capeillère-Blandin et al., 2004) ad influenzare maggiormente le AOPP. Inoltre, nel presente esperimento, non sono state osservate particolari variazioni dei carbonili presenti nel liquido seminale.

Per questi motivi, si è scelto di iniziare l'indagine dalla presenza di di-tirosina (DT) nelle proteine del liquido seminale. La DT può originare da reazioni di ossidazione e costituisce una componente delle AOPP (Malencik & Anderson, 2003).

In particolare, si è scelto di utilizzare la spettroscopia a fluorescenza e il Western Blot (WB), dove il WB è stato applicato solamente a 24 campioni selezionati in base al contenuto di AOPP.

Nelle analisi WB è stato dimostrato che i residui di DT sono presenti in misura maggiore in determinati PM (11 kDa, 14,5 kDa, 36 kDa). Infatti, considerando gli studi in proteomica, le proteine prevalentemente analizzate del plasma seminale bovino sono le Bovine Seminal Plasma Proteins (BSP) A1, A2 e A3, e sono espresse soprattutto a livello della banda di 14 kDa (Moura et al., 2007). Successivamente è stata presa in esame l'intensità di fluorescenza di ciascuna banda, e posta in relazione alla concentrazione di AOPP. La relazione tra AOPP e DT è maggiormente espressa quando il contenuto di AOPP è al di sopra di 100 nmol/mL. Infatti, valutando l'intensità di fluorescenza della DT per ogni PM, all'aumento di AOPP (> 100 nmol/mL) si ha un incremento del contenuto di DT.

Tra le componenti delle AOPP che potrebbero avere influenzato le relazioni tra la loro concentrazione e alcune caratteristiche del plasma seminale si devono ricordare gli addotti. Questi si formano da lipoproteine ossidate o dalla glico-ossidazione delle proteine, e portano rispettivamente alla formazione di ALE (prodotti avanzati della lipossidazione) o di AGE (prodotti avanzati della glicazione) (Da Dalt, 2011). Tali addotti saranno oggetto di futuri approfondimenti.

8. CONCLUSIONE

In conclusione, lo studio pone l'attenzione sul ruolo delle variabili ambientali nell'influenzare la qualità seminale, e sull'approfondimento del significato biologico delle AOPP come marker della funzionalità seminale, non necessariamente associate allo stress ossidativo.

Dallo studio è emerso che:

- a. Il THI ambientale, sia dei 60 giorni precedenti alla raccolta sia delle 24h, ha relazioni positive con i principali parametri di motilità.
È da sottolineare però che il THI dei 60 giorni agisce maggiormente nello sviluppo di anomalie spermatiche maggiori e minori.
- b. È stato dimostrato che la concentrazione di AOPP si relaziona positivamente sia con la motilità spermatica, sia con il THI ambientale.
- c. Inoltre, la DT si esprime maggiormente a determinati PM e a concentrazioni elevate di AOPP.

È evidente come lo stress ossidativo si relazioni allo stress da calore, ma non è ancora completamente compreso a che stadio di spermatogenesi gli effetti del THI siano effettivamente maggiori. È inoltre significativo analizzare le AOPP e le rispettive componenti per interpretare con maggior precisione l'interazione con la motilità spermatica.

L'obiettivo di perseguire una sempre più sostenibile pratica allevatoria richiede una ricerca multidisciplinare che copra più aree di indagine. Per quanto riguarda i fattori ambientali, non solo lo studio della temperatura e dell'umidità ma anche, eventualmente, dell'intensità luminosa e l'esposizione alla luce possono contribuire a chiarire l'impatto delle condizioni ambientali sulla gametogenesi. Mentre, nell'analisi dello stress ossidativo, approfondire gli elementi prodotti dalle AOPP come la DT e gli addotti può chiarire l'azione dell'ossidazione sui parametri seminali, oppure contribuire ad evidenziare alcuni aspetti funzionali delle proteine del liquido seminale.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento alla relatrice del progetto tesi prof.ssa Elisa Giaretta, al correlatore prof. Gianfranco Gabai per tutto il lavoro svolto nella realizzazione della ricerca, e al prof. Paolo Mongillo.

Alla dott.ssa Laura Da Dalt per le analisi di laboratorio e il dipartimento BCA dell'Università degli Studi di Padova.

Un importante ringraziamento all'azienda Riccchieri di Fiume Veneto e all'associazione ANAPRI per aver permesso lo svolgimento dello studio: al dott. Degano, al dott. Vicario, al dott. Pivetta e agli operatori dello stabilimento.

Si desidera ringraziare inoltre il prof. Stradaoli dell'Università di Udine e le sue colleghe dott.sse Pausa Corte e Urli per la partecipazione alla raccolta dati.

TABELLE ACRONIMI

Tabella 13. Acronimi generali

AOPP	Advanced Oxidation Protein Products
Anomalie Mag	Anomalie maggiori
Anomalie Min.	Anomalie minori
CONC.	Concentrazione
CT	Gruppi Carbonili
DMI	Dry Matter Intake – Ingestione di Sostanza Secca
DS	Deviazione Standard
DT	Di-Tirosina
PM	Peso Molecolare
PS	Plasma Seminale
ROS	Reactive Oxygen Species - Specie Reattive dell'Ossigeno
SPZ norm.	Spermatozoi normali
SPZ norm. vivi	Spermatozoi normali vivi
THI	Temperature-Humidity Index - Indice di Temperatura-Umidità
THIO	Tioli
TP	Proteine Totali
TST	Testosterone
WB	Western Blot

Tabella 14. Acronimi dei parametri di motilità

TM	Motilità totale
PM	Motilità progressiva
VCL	Velocità curvilinea
VAP	Velocità media
VSL	Velocità rettilinea
STR	Rettilineità
LIN	Linearità
ALH	Spostamento laterale della testa medio
mALH	Spostamento laterale della testa massimo
BCF	Frequenza
WOB	Oscillazione
SLOW	Spermatozoi a velocità lenta
MEDIUM	Spermatozoi a velocità media

BIBLIOGRAFIA

- Aida A. Mahmoud. (2013). Protective Effect of Myricetin on Proteins and Lipids of Erythrocytes Membranes. *Asian Journal of Biological Sciences*, 76–83 (Vol. 6, Issue 1). <https://doi.org/10.3923/ajbs.2013.76.83>
- Anahí Lendez, P., María Farias, V. N., Lucía Cuesta, M., Adrián, Vater, A., Ghezzi, M. D., Daniel Mota-Rojas, Guillermina, Dolcini, L., & Ceriani, M. C. (2020). Estrés por calor: su efecto sobre el estado inmunológico de las vacas lecheras Heat stress: its effect on the immune status of dairy cows. In *Rev. med. vet. (En línea)* (Vol. 101, Issue 3). https://www.campolitoral.com.ar/?m=interior&id_um=228217-
- Barati, E., Nikzad, H., & Karimian, M. (2020). Oxidative stress and male infertility: current knowledge of pathophysiology and role of antioxidant therapy in disease management. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 77, Issue 1, pp. 93–113). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03253-8>
- Bilodeau, J.-F., Blanchette, S., Gagnon, I. C., & Sirard, M.-A. (2001). Thiols prevent H₂O – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. In *Theriogenology* (Vol. 56, pp. 275 – 286)
- Biniová, Z., Ducháček, J., Stádník, L., Doležalová, M., & Hájek, R. (2017). Effects of climatic conditions on bovine semen characteristics. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 65(1), 17–23. <https://doi.org/10.11118/actaun201765010017>
- Blanco-Prieto, O., Mislei, B., Martínez-Pastor, F., Spinaci, M., Mari, G., & Bucci, D. (2023). Study of mitochondrial function in thawed bull spermatozoa using selective electron transfer chain inhibitors. *Theriogenology*, 208, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.05.021>
- Bordignon, M., Da Dalt, L., Marinelli, L., & Gabai, G. (2014). Advanced oxidation protein products are generated by bovine neutrophils and inhibit free radical production in vitro. *Veterinary Journal*, 199(1), 162–168. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.028>

- Brown, J. L., Wasser, S. K., Wildt, D. E., & Graham, L. H. (1994). Comparative Aspects of Steroid Hormone Metabolism and Ovarian Activity in Felids, Measured Noninvasively in Feces'. In *Biology of Reproduction* (Vol. 51). <https://academic.oup.com/biolreprod/article/51/4/776/2761469>
- Capeillère-Blandin, C., Gausson, V., Descamps-Latscha, B., & Witko-Sarsat, V. (2004). Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1689(2), 91–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.02.008>
- Capela, L., Leites, I., Romão, R., Lopes-Da-costa, L., & Pereira, R. M. L. N. (2022). Impact of Heat Stress on Bovine Sperm Quality and Competence. In *Animals* (Vol. 12, Issue 8). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ani12080975>
- Castiglioni, V. C., Perez Siqueira, A. F., de Cássia Bicudo, L., de Almeida, T. G., dos Santos Hamilton, T. R., de Castro, L. S., Mendes, C. M., Nichi, M., de Agostini Losano, J. D., Visitin, J. A., & D'Ávila Assumpção, M. E. O. (2021). Lipid peroxidation in bull semen influences sperm traits and oxidative potential of Percoll®-selected sperm. *Zygote*, 29(6), 476–483. <https://doi.org/10.1017/S0967199421000228>
- Celi Pietro, & Gabai Gianfranco. (2015). Oxidant_antioxidant balance in animal nutrition and health the role of protein oxidation Enhanced Reader. *Frontiers in Veterinary Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00048>
- Colombo, G., Clerici, M., Giustarini, D., Portinaro, N., Badalamenti, S., Rossi, R., Milzani, A., & Dalle-Donne, I. (2015). A central role for intermolecular dityrosine cross-linking of fibrinogen in high molecular weight advanced oxidation protein product (AOPP) formation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.09.024>
- Da Dalt Laura. (2011). *Caratterizzazione delle AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) come indicatori di stress ossidativo e processi infiammatori nella bovina*. (Tesi di Dottorato, Università degli Studi di Padova)

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., & Colombo, R. (2003). Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 329, Issues 1–2, pp. 23–38). Elsevier.
[https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(03\)00003-2](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(03)00003-2)
- Ellman, G. L. (1959). Tissue Sulphydryl Groups. In *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- Fiaz, M., Usmani, R. H., Abdullah, M., & Ahmad, T. (2009). Evaluation of Semen Quality of Holstein Friesian and Jersey Bulls Maintained under Subtropica Environment. In *Pakistan Veterinary Journal*
www.pvj.com.pk
- Filipčík, R., Rečková, Z., Pešan, V., Konoval, O., & Kopec, T. (2023). Evaluation of semen parameters from Fleckvieh-Simmental bulls and the influence of age and season of collection. *Archives Animal Breeding*, 66(1), 113–120.
<https://doi.org/10.5194/aab-66-113-2023>
- Fontoura, A. B. P., Montanholi, Y. R., Diel De Amorim, M., Foster, R. A., Chenier, T., & Miller, S. P. (2016). Associations between feed efficiency, sexual maturity and fertility-related measures in young beef bulls. *Animal*, 10(1), 96–105.
<https://doi.org/10.1017/S1751731115001925>
- Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C., & Sölkner, J. (2006). Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science*, 95(1–2), 27–37.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.09.002>
- Giaretta, E., Munerato, M., Yeste, M., Galeati, G., Spinaci, M., Tamanini, C., Mari, G., & Bucci, D. (2017). Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: Relationship with other sperm quality parameters. *Animal Reproduction Science*, 176, 11–19.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.11.003>

- Gonçalves, A. A., Garcia, A. R., Rolim Filho, S. T., Silva, J. A. R. da, Melo, D. N. de, Guimarães, T. C., Tavares, H. R., Silva, T. V. G., Souza, E. B. de, Santos, S. do S. D., & Ohashi, O. M. (2021). Scrotal thermoregulation and sequential sperm abnormalities in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) under short-term heat stress. *Journal of Thermal Biology*, 96.
<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.102842>
- Guthrie, H. D., & Welch, G. R. (2012). Effects of reactive oxygen species on sperm function. In *Theriogenology* (Vol. 78, Issue 8, pp. 1700–1708).
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.05.002>
- Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa.
- Heinecke, J. W., Li, W., Daehnke, H. L., & Goldstein, J. A. (1993). Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 268(6), 4069–4077.
[https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53581-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53581-x)
- Hitit, M., Ugur, M. R., Dinh, T. T. N., Sajeev, D., Kaya, A., Topper, E., Tan, W., & Memili, E. (2020). Cellular and Functional Physiopathology of Bull Sperm With Altered Sperm Freezability. *Frontiers in Veterinary Science*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.581137>
- Isnaini, N., Wahjuningsih, S., & Adhitama, E. (2019). Seasonal effects on semen quality of ongole crossbred and simmental bulls used for artificial insemination.
<https://www.researchgate.net/publication/333377452>
- Johnson, W. H., Pmpson, J. A., James Umi-Diaka, L., Lb, Y., Wilton, J. W., & Mandell, I. B. (1994). The determination and correlation of reproductive parameters of performance-testes Hereford and simmental bulls. In *Theriogenology*. Vol. 44, 973 – 982.
- Juárez-Rojas, L., Casillas, F., López, A., Betancourt, M., Ommati, M. M., & Retana-Márquez, S. (2022). Physiological role of reactive oxygen species in testis and epididymal spermatozoa. In *Andrologia* (Vol. 54, Issue 4). John Wiley and Sons Inc.
<https://doi.org/10.1111/and.14367>

- Juyena, N. S., & Stelletta, C. (2012). Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. In *Journal of Andrology* (Vol. 33, Issue 4, pp. 536–551). <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012583>
- Kamal, R., Dutt, T., Patel, M., Dey, A., Bharti, P. K., & Chandran, P. C. (2018). Heat stress and effect of shade materials on hormonal and behavior response of dairy cattle: a review. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 50, Issue 4, pp. 701–706). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s11250-018-1542-6>
- Kapš, M., Posavi, M., Stipiae, N., & Mikuliae, B. (2000). Genetic Evaluation of Semen and Growth Traits of Young Simmental Bulls in Performance Test. In *ACS Agricultural Science & Technology Journal*. Vol. 65, Issue 1, 15 - 20.
- Kastelic, J. P. (2014). Understanding and evaluating bovine testes. In *Theriogenology* (Vol. 81, Issue 1, pp. 18–23). <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.001>
- Kefer, J. C., Agarwal, A., & Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. In *International Journal of Urology* (Vol. 16, Issue 5, pp. 449–457). <https://doi.org/10.1111/j.1442-2042.2009.02280.x>
- Koonjaenak, S., Pongpeng, P., Wirojwuthikul, S., Johannisson, A., Kunavongkrit, A., & Rodriguez-Martinez, H. (2007). Seasonality affects post-thaw plasma membrane intactness and sperm velocities in spermatozoa from Thai AI swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 67(9), 1424–1435. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.02.010>
- Koziol, J. H., Sheets, T., Wickware, C. L., & Johnson, T. A. (2022). Composition and diversity of the seminal microbiota in bulls and its association with semen parameters. *Theriogenology*, 182, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.01.029>
- Kratz E. M., & Piwowar A. (2017). Melatonin, Advanced Oxidation Protein Products and Total Antioxidant Capacity as Seminal Parameters of Prooxidant-antioxidant Balance and their Connection with Expression of Metalloproteinases in Context of Male Fertility. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 5(68), 659–668.

- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Ahn, B.-W., Shaltiel, S., & Stadtman, E. R. (1990). Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. In *Method in Enzymology*. Vol. 186.
- Llamas-Luceño, N., Hostens, M., Mullaart, E., Broekhuijse, M., Lonergan, P., & Van Soom, A. (2020). High temperature-humidity index compromises sperm quality and fertility of Holstein bulls in temperate climates. *Journal of Dairy Science*, *103*(10), 9502–9514.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-18089>
- Mader, T. L., Arias, R., & Arias, R. A. (2009). Effects of Environmental Factors on Body Temperature of Feedlot Cattle. In *Nebraska Beef report*. 102-104
<http://digitalcommons.unl.edu/animalscincbr/510>
- Malencik, D. A., & Anderson, S. R. (2003). Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. In *Amino Acids* (Vol. 25, Issues 3–4, pp. 233–247).
<https://doi.org/10.1007/s00726-003-0014-z>
- Malo, A. F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A. J., & Roldan, E. R. S. (2006). Sperm design and sperm function. *Biology Letters*, *2*(2), 246–249.
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2006.0449>
- Memili, E., Moura, A. A., & Kaya, A. (2020). Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 220). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106355>
- Menezes, E. B., Velho, A. L. C., Santos, F., Dinh, T., Kaya, A., Topper, E., Moura, A. A., & Memili, E. (2019). Uncovering sperm metabolome to discover biomarkers for bull fertility. *BMC Genomics*, *20*(1).
<https://doi.org/10.1186/s12864-019-6074-6>
- Morrell, J. M. (2020). Heat stress and bull fertility. In *Theriogenology* (Vol. 153, pp. 62–67). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.014>
- Mostek, A., Dietrich, M. A., Słowińska, M., & Ciereszko, A. (2017). Cryopreservation of bull semen is associated with carbonylation of sperm proteins. *Theriogenology*, *92*, 95–102.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.011>

- Mostek, A., Westfalewicz, B., Słowińska, M., Dietrich, M. A., Judycka, S., & Ciereszko, A. (2018). Differences in sperm protein abundance and carbonylation level in bull ejaculates of low and high quality. *PLoS ONE*, *13*(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206150>
- Moura, A. A., Chapman, D. A., Koc, H., & Killian, G. J. (2007). A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*, *98*(3–4), 169–188.
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.03.012>
- Nichi, M., Bols, P. E. J., Züge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., & Cortada, C. N. M. (2006). Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology*, *66*(4), 822–828.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.056>
- O’Flaherty, C., & Matsushita-Fournier, D. (2017). Reactive oxygen species and protein modifications in spermatozoa. In *Biology of Reproduction* (Vol. 97, Issue 4, pp. 577–585). Oxford University Press.
<https://doi.org/10.1093/biolre/iox104>
- O’Hara, L., & Smith, L. B. (2015). Androgen receptor roles in spermatogenesis and infertility. In *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* (Vol. 29, Issue 4, pp. 595–605). Bailliere Tindall Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.006>
- Ouellet, V., Toledo, I. M., Dado-Senn, B., Dahl, G. E., & Laporta, J. (2021). Critical Temperature-Humidity Index Thresholds for Dry Cows in a Subtropical Climate. *Frontiers in Animal Science*, *2*.
<https://doi.org/10.3389/fanim.2021.706636>
- Patrat, C., Serres, C., & Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. In *Biology of the Cell* (Vol. 92, Issues 3–4, pp. 255–266). Elsevier Masson SAS.
[https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(00\)01072-8](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(00)01072-8)

Pause Corte Francesca, Crociati Martina, Susy Urli, Monaci Maurizio, Degano Lorenzo, & Stradaoli Giuseppe. (2022). Environmental Factors Affecting the Reproductive Efficiency of Italian Simmental Young Bulls. *Animals*, 12(2476).

<http://doi.org/10.3390/ani12182476>

Rahman, M. B., Schellander, K., Luceño, N. L., & Van Soom, A. (2018). Heat stress responses in spermatozoa: Mechanisms and consequences for cattle fertility. In *Theriogenology* (Vol. 113, pp. 102–112). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.012>

Renato de Oliveira Menegassi, S., Pereira, G. R., Kuczynski da Rocha, M., Koetz, C., Dias Lopes, L. F., August, P. M., Matté, C., Teixeira Gomes, M. G., de Cássia Trevisan Dal Bem, J., Andrighetto Canozzi, M. E., & Jardim Barcellos, J. O. (2022). Influence of tropical, subtropical, and temperate climate conditions on seminal redox status and sperm quality parameters in breeding bulls. *Journal of Thermal Biology*, 109.

<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2022.103319>

Satrio, F. A., Karja, N. W. K., Setiadi, M. A., Kaiin, E. M., Kurnia, A., & Purwantara, B. (2022). Productivity and fresh semen characteristics of Simmental Bulls of different ages. In *Jurnal Kedokteran Hewan - Indonesian Journal of Veterinary Sciences*, 16(1), 23–28.

<https://doi.org/10.21157/j.ked.hewan.v16i1.23487>

Selmeci, L. (2011). Advanced oxidation protein products (AOPP): Novel uremic toxins, or components of the non-enzymatic antioxidant system of the plasma proteome? In *Free Radical Research* (Vol. 45, Issue 10, pp. 1115–1123).

<https://doi.org/10.3109/10715762.2011.602074>

Sharma, M. (2018). Effect of season on seminal characteristics of bovine bull. In *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(5), 2332 – 2336.

Sharma, R., Agarwal, A., Mohanty, G., Du Plessis, S. S., Gopalan, B., Willard, B., Yadav, S. P., & Sabanegh, E. (2013). Proteomic analysis of seminal fluid from men exhibiting oxidative stress. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11(1).

<https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-85>

- Simontacchi, C., Perez De Altamirano, T., Marinelli, L., Angeletti, R., & Gabai, G. (2004). Plasma Steroid Variations in Bull Calves Repeatedly Treated with Testosterone, Nortestosterone and Oestradiol Administered Alone or in Combination. In *Veterinary Research Communications* (Vol. 28, Issue 6).
- Staub, C., & Johnson, L. (2018). Review: Spermatogenesis in the bull. In *Animal* (Vol. 12, Issue 1, pp. s27–s35). Cambridge University Press.
<https://doi.org/10.1017/S1751731118000435>
- Storey, B. T. (2008). Mammalian sperm metabolism: Oxygen and sugar, friend and foe. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5–6), 427–437.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.072522bs>
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., & Schmitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries1. *Journal of Dairy Science*, 86(SUPPL. 1).
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)
- Takahashi, M. (2012). Heat stress on reproductive function and fertility in mammals. In *Reproductive Medicine and Biology* (Vol. 11, Issue 1, pp. 37–47). John Wiley and Sons Ltd.
<https://doi.org/10.1007/s12522-011-0105-6>
- Toshimori, K. (2003). Biology of spermatozoa maturation: An overview with an introduction to this issue. In *Microscopy Research and Technique* (Vol. 61, Issue 1, pp. 1–6). Wiley-Liss Inc.
<https://doi.org/10.1002/jemt.10311>
- Tvrđá, E., Lukáč, N., Schneidgenová, M., Lukáčová, J., Szabó, C., Goc, Z., Greň, A., & Massányi, P. (2013). Impact of Seminal Chemical Elements on the Oxidative Balance in Bovine Seminal Plasma and Spermatozoa. *Journal of Veterinary Medicine*, 2013, 1–8.
<https://doi.org/10.1155/2013/125096>

- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., & Memili, E. (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. In *Frontiers in Veterinary Science* (Vol. 6). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Upadhyay, V. R., Ramesh, V., Dewry, R. K., Yadav, D. K., & Ponraj, P. (2022). Bimodal interplay of reactive oxygen and nitrogen species in physiology and pathophysiology of bovine sperm function. In *Theriogenology* (Vol. 187, pp. 82–94). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.04.024>
- Valeanu, S., Johannisson, A., Lundeheim, N., & Morrell, J. M. (2015). Seasonal variation in sperm quality parameters in Swedish red dairy bulls used for artificial insemination. *Livestock Science*, *173*, 111–118.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.12.005>
- Van Tran, L., Malla, B. A., Kumar, S., & Tyagi, A. K. (2017). Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction - A Review. In *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* (Vol. 30, Issue 5, pp. 622–637).
<https://doi.org/10.5713/ajas.15.1034>
- Vigolo, V., Giaretta, E., Da Dalt, L., Damiani, J., Gabai, G., Bertuzzo, F., & Falomo, M. E. (2022). Relationships between Biomarkers of Oxidative Stress in Seminal Plasma and Sperm Motility in Bulls before and after Cryopreservation. *Animals*, *12*(19).
<https://doi.org/10.3390/ani12192534>
- Walker, W. H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 365, Issue 1546, pp. 1557–1569).
<https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0258>
- Westfalewicz, B., Dietrich, M. A., Mostek, A., Partyka, A., Bielas, W., Nizański, W., & Ciereszko, A. (2017). Analysis of bull (*Bos taurus*) seminal vesicle fluid proteome in relation to seminal plasma proteome. *Journal of Dairy Science*, *100*(3), 2282–2298.
<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11866>

- Wettemann, R. P., & Boehmer, B. H. (2014). Influence of Heat Stress on Male Fertility. 257 – 263.
- Willforss, J., Morrell, J. M., Resjö, S., Hallap, T., Padrik, P., Siino, V., de Koning, D. J., Andreasson, E., Levander, F., & Humblot, P. (2021). Stable bull fertility protein markers in seminal plasma. *Journal of Proteomics*, 236. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104135>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. In *Kidney International* (Vol. 49).
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Nguyen Khoa, T., Capeillère-Blandin, C., Nguyen, A. T., Canteloup, S., Dayer, J.-M., Jungers, P., Drü, T., & Descamps-Latscha, B. (1998). Advanced Oxidation Protein Products as Novel Mediators of Inflammation and Monocyte Activation in Chronic Renal Failure. In *The Journal of Immunology* (Vol. 161). <http://journals.aai.org/jimmunol/articlepdf/161/5/2524/1089889/im179802524o.pdf>