



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute**

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

USO DELLA VITAMINA B12 NELL'EXTENDER PER IL  
SEME DI STALLONE REFRIGERATO

Relatore:

Prof.ssa Maria Elena Falomo

Correlatore:

Dott.ssa Veronica Vigolo

Laureanda:

Giada Loddo

Matricola n.

1178351

ANNO ACCADEMICO 2021/2022



# SOMMARIO

<b>RIASSUNTO</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	7
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	9
<b>1.1 ANATOMIA RIPRODUTTORE MASCHILE E GHIANDOLE ANNESSE</b> .....	9
1.1.1 TESTICOLO.....	10
1.1.2 EPIDIDIMO.....	12
1.1.3 GHIANDOLE ACCESSORIE.....	13
<b>1.2 FISILOGIA ED ENDOCRINOLOGIA</b> .....	13
1.2.1 CELLULE DEL SERTOLI.....	14
1.2.2 CELLULE DEL LEYDIG.....	15
1.2.3 EPIDIDIMO.....	16
1.2.4 GHIANDOLE ACCESSORIE.....	17
1.2.5 ORMONI ENDOCRINI.....	17
1.2.6 EIACULAZIONE.....	19
<b>1.3 SPERMATOGENESI</b> .....	19
1.3.1 LO SPERMATOZOO.....	21
1.3.2 SPERMATOGONI (SPERMATOCITOGENESI).....	22
1.3.3 SPERMATOCITI (MEIOSI).....	23
1.3.4 SPERMATIDI (SPERMIOGENESI).....	24
<b>1.4 FUNZIONE SPERMATOZOI</b> .....	26
1.4.1 MEMBRANA PLASMATICA.....	26
1.4.2 TESTA.....	28
1.4.3 COLLO.....	28
1.4.4 SEGMENTO INTERMEDIO, PRINCIPALE E TERMINALE.....	29
1.4.5 MOTILITÀ SPERMATICA.....	30
<b>1.5 ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES (ART)</b> .....	31
1.5.1 METODOLOGIE DI RACCOLTA DEL SEME.....	31
1.5.2 VALUTAZIONE DEL SEME.....	33
1.5.3 EXTENDER.....	36
1.5.4 METODICHE DI CONSERVAZIONE DEL SEME.....	38
<b>1.6 ALTERAZIONI DELLA FUNZIONALITÀ SPERMATICA</b> .....	40
1.6.1 ANOMALIE DELLO SPERMATOZOO.....	40

1.6.2	STRESS OSSIDATIVO.....	42
1.7	VITAMINA B12.....	44
2.	<b>OBIETTIVI.....</b>	<b>51</b>
3.	<b>MATERIALI E METODI.....</b>	<b>52</b>
3.1	DISEGNO SPERIMENTALE.....	52
3.2	MATERIALI.....	52
3.3	METODI.....	55
4.	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>59</b>
4.1	ANALISI STATISTICA.....	59
4.2	RISULTATI.....	59
4.3	DISCUSSIONE.....	68
5.	<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>75</b>
6.	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>77</b>

## RIASSUNTO

La bassa concentrazione plasmatica di Vitamina B12 in soggetti infertili rispetto a soggetti fertili e la sua supplementazione è stata studiata nell'uomo sin dagli anni '60. Questi studi hanno dimostrato il miglioramento della conta spermatica, della morfologia, della motilità e del DNA spermatico.

Ad oggi, l'effetto positivo dell'uso della Vitamina B12 sugli extender per il seme è stato dimostrato solamente nel toro e nell'ariete. Per quanto riguarda lo stallone vi sono solo due studi che trattano l'uso della B12, in entrambi è stata somministrata in associazione al butafosfano tramite iniezioni intramuscolo, ma i risultati non hanno mostrato alcuna influenza sul seme di stallone refrigerato.

Lo studio si basa su un gruppo di 6 stalloni a cui è stato prelevato il seme, tramite vagina artificiale, per tre volte a distanza di 48 ore ciascuno. Per ogni prelievo sono stati creati sei campioni, due di controllo (CTRL) a 0 (T0) e dopo 24 ore (T24) e quattro con l'aggiunta della Vitamina B12 a diversi dosaggi (A, B, C e D).

Tutti i campioni sono stati valutati dopo essere stati conservati a +4°C per 24 ore, mentre CTRL a T0 è stato analizzato dopo essere stato diluito con l'extender INRA96. I parametri presi in considerazione sono stati la motilità degli spermatozoi (%MOT), la motilità progressiva (%PMS), la velocità del percorso medio (VAP), la velocità lineare (VSL), la velocità curva (VCL), l'ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH), linearità (STR), l'indice di linearità (LIN), la vitalità (%LIVE), la morfologia del seme (%NORMAL), l'integrità dell'acrosoma (%ACR) e la funzionalità di membrana (%HOS+).

Tra CTRL a T0 e controllo e trattamento a T24 si sono evidenziati dei miglioramenti nella %HOS+, i campioni B, C, D e CTRL a T24 mostrano i valori più elevati ( $P < 0,001$ ), e nella %ACR, tutti i campioni trattati tranne B hanno valori superiori al CTRL a T0. I campioni A, B e C presentano valori di %LIVE simili rispetto al CTRL T0 e significativamente superiori a D e CTRL a T24. Non si sono evidenziate, tuttavia, differenze statisticamente rilevanti ( $P > 0,1$ ) per quanto riguarda %MOT, %PMS, VAP, VSL, VCL, ALH, STR, LIN e la percentuale di spermatozoi normali. Nonostante ciò, si è osservato un aumento del 10% o maggiore della motilità totale per ogni campione trattato con la B12 rispetto al CTRL a T24 per ogni stallone valutato.

In conclusione, possiamo supporre che l'uso della vitamina B12 non consente di ottenere un seme refrigerato per 24 ore qualitativamente migliore rispetto ad uno stesso seme non trattato, ma si rendono necessari ulteriori studi in vivo, in vitro e con un gruppo più ampio di stalloni di razze diverse per determinare l'effettivo aumento di fertilità del seme refrigerato trattato con la cobalamina.



## ABSTRACT

The low plasma concentration of Vitamin B12 in infertile subjects compared to fertile subjects and its supplementation has been studied in human since 1960s. These studies established the improvement in sperm count, morphology, motility and sperm DNA.

To date, the positive effect of the use of Vitamin B12 on the extender of semen has only been demonstrated in bull and ram. As for the stallion, the two only studies dealing with the use of B12 involved administration in association with butaphosphane via intramuscular injections, but the results didn't show any influence on the refrigerated stallion semen.

This study is based on a group of six stallions whose semen was taken through an artificial vagina three times every 48 hours each. Six samples were created for each sample, two control (CTRL) at zero (T0) and twenty-four (T24) hours and four with the addition of 1.25 mg/mL (A), 2.50 mg/mL (B), 3.45 mg/mL (C) and 5.00 mg/mL (D) of Vitamin B12.

All the samples were evaluated after being stored at 4°C for 24 hours, while the control (CTRL) at T0 was analysed even after being diluted with the extender INRA96. The parameters considered were sperm motility (%MOT), progressive motility (%PMS), velocity of the average path (VAP), straight line velocity (VSL), curvilinear line velocity (VCL), amplitude of the lateral head displacement (ALH), straightness (STR), linearity index (LIN), vitality (%LIVE), morphology (%NORMAL), acrosome integrity (%ACR) and membrane functionality (%HOS+).

Between CTRL at T0 and control and treatment at T24 there have been some improvements in the %HOS+, B, C D and CTRL at T24 show higher values ( $P < 0.001$ ), and in the %ACR, all samples except B have high values than CTRL at T0. A, B and C had similar value of %LIVE compared to CTRL at T0 e significantly higher than D and CTRL at T24. There are no statistically relevant differences ( $P > 0.1$ ) about %MOT, %PMS, VAP, VSL, VCL, ALH, STR, LIN and % of normal sperm. Despite a 10% or greater increase in total motility was observed for each sample treated with B12 compared to the CTRL at T24 for each stallion evaluated.

In conclusion, we can't suppose that the use of Vitamin B12 allows to obtain a semen cooled for 24 hours qualitatively better than the same untreated semen, but we need more studies in vivo, in vitro and with more stallions of different breeds to determinate the increase of cooled semen fertility with cobalamin.

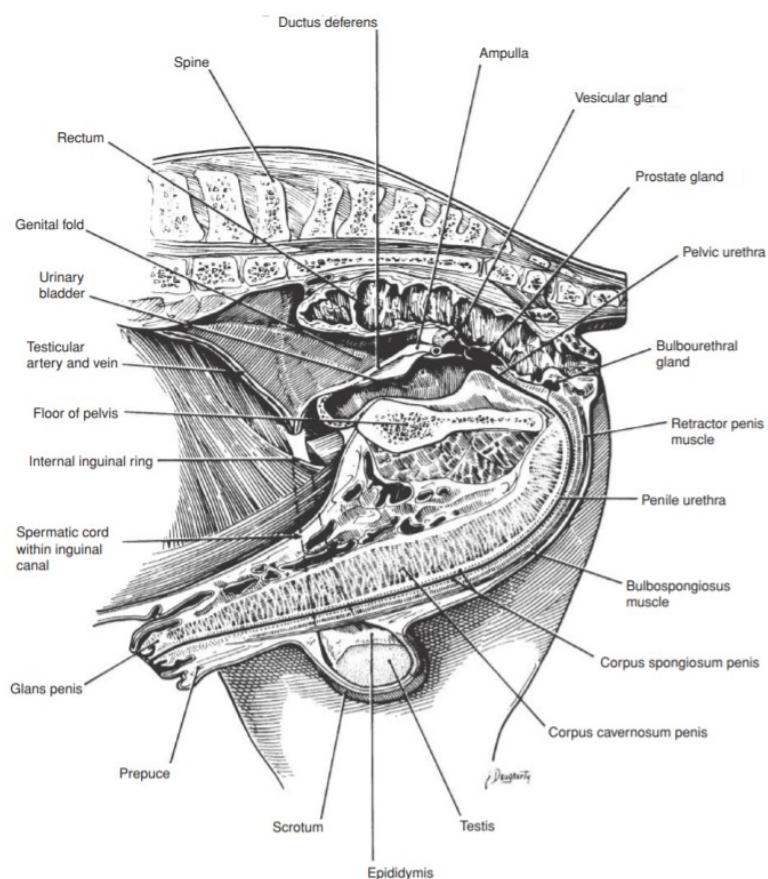




# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 ANATOMIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLO STALLONE

L'apparato riproduttore maschile dello stallone è composto da due testicoli, entrambi sostenuti dal muscolo cremastere e dal funicolo spermatico, due epididimi, due dotti deferenti provvisti di ampolla, due ghiandole vescicolari, prostata, due ghiandole bulbouretrali, un pene e i muscoli associati quali retrattore del pene, ischiocavernoso, bulbospongioso ed uretrale (Fig. 1). Esternamente è contenuto nello scroto e nel prepuzio mentre internamente è sostenuto dal bacino genitale. Sulla base dello studio effettuato verranno trattate solamente le componenti aventi un ruolo decisivo sulla produzione del seme quali testicolo, epididimo e ghiandole accessorie.

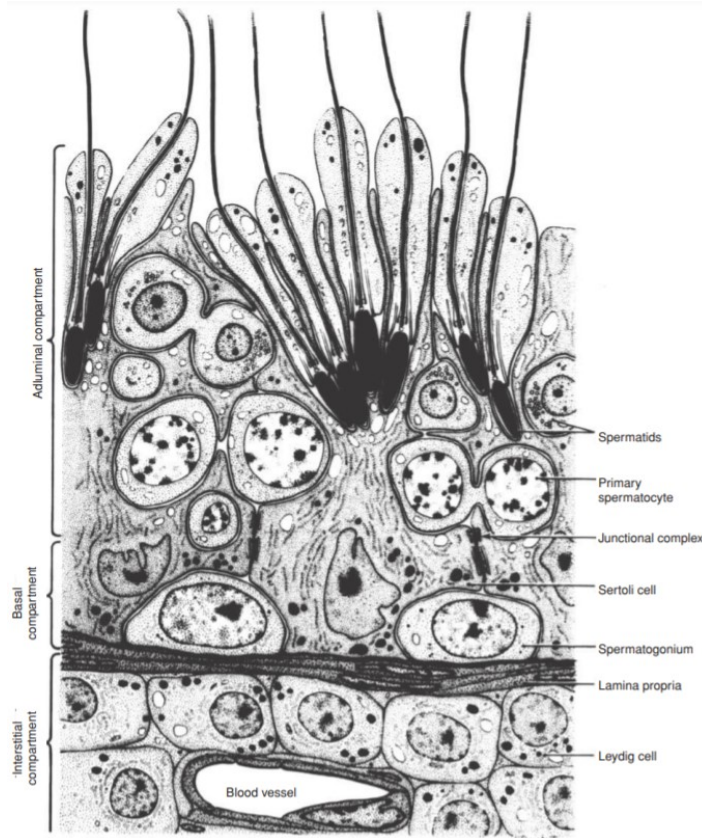


**Fig. 1** Sezione laterale del tratto riproduttivo dello stallone

### 1.1.1 TESTICOLO

Il testicolo è la gonade maschile, in grado di produrre spermatozoi e testosterone. Presenta una forma ovoidale lungo l'asse orizzontale e quando vengono retratti l'asse lungo tende a diventare più verticale. I testicoli degli stalloni post pubertà presentano dimensioni variabili ma l'età e la stazione influenzano notevolmente il peso del testicolo. La tonaca albuginea, capsula di tessuto connettivo di ogni testicolo, è fusa alla tonaca vaginale viscerale. Inoltre, dalla tonaca albuginea partono delle porzioni di tessuto connettivo che dividono il testicolo in lobuli detti lobuli testis. Il parenchima aumenta con l'aumentare dell'età ed è composto da compartimento seminifero e compartimento interstiziale. Il compartimento interstiziale (interstitium testis) è composto da vasi sanguigni, tessuto connettivo, tessuto linfatico, nervi e cellule del Leydig che producono testosterone. A mano a mano che lo stallone invecchia, le cellule del Leydig post pubertà vengono gradualmente sostituite da quelle adulte contenenti abbondanti lipidi pigmentati, interconnesse da interdigitazioni e possono produrre un quantitativo di testosterone superiore a quelle degli stalloni più giovani. Il comparto tubulare è costituito da:

- epitelio seminifero;
- cellule del Sertoli;
- sviluppo cellule germinali;
- cellule peritubulari.



**Fig. 2** Sezione dei tubuli seminiferi dello stallone

L'epitelio seminifero è costituito da due regioni principali note come compartimento basale (periferica), che ospita spermatogoni e gli spermatociti primari, e adluminale (interna), che ospita spermatociti primari, secondari e spermatidi. Le cellule del Sertoli sono ancorate alla membrana basale, circondano la popolazione delle cellule germinali in via di sviluppo e sono strettamente attaccate l'una all'altra tramite tight junctions. Le giunzioni tra le cellule del Sertoli formano una barriera di permeabilità specializzata che impedisce a sostanze di grande peso molecolare e cellule immunitarie di accedere al comparto. Insieme alle cellule peritubulari formano la barriera emato-testicolare che previene la distruzione immunologica delle cellule germinali in sviluppo. Nello stallone i danni alla barriera emato-testicolare sono rari ma possono causare danni al testicolo riducendo la produzione di spermatozoi o inducendo la sterilità. Il numero delle cellule del Sertoli e di cellule germinali sono caratteristiche di una specie e il numero di cellule del Sertoli è un tratto ad alta ereditabilità. Qualsiasi trattamento che riduca il numero di cellule del Sertoli formatesi prima della

pubertà o ne alteri la loro funzione probabilmente influenzerà negativamente la produzione di spermatozoi.

Il tubulo seminifero è costituito da tre zone e la parte principale (tubulo seminifero contorto) è a spirale ed è il sito di produzione degli spermatozoi. È rivestito da un epitelio seminifero che contiene cellule del Sertoli e diversi tipi di cellule germinali. Gli spermatogoni e le cellule del Sertoli rivestono la membrana basale dei tubuli e le cellule del Sertoli sono disposte radialmente verso il lume. Sebbene si ritenga che le cellule del Sertoli non si dividano dopo la pubertà, ci sono degli studi recenti che dimostrano una loro proliferazione con l'avvicinarsi della stagione riproduttiva. Entrambe le estremità del tubulo seminifero contorto proseguono come zone di transizione affusolate che portano alle porzioni dritte del tubulo seminifero. I tubuli dritti sono la prima componente tramite cui gli spermatozoi passano all'epididimo e convergono nei due terzi craniali del testicolo detti rete testis. I tubuli della rete intratesticolare penetrano nella tunica albuginea, continuano come rete extra testicolare e finiscono fondendosi con 13-15 dotti efferenti che portano al dotto epididimale. I cavalli sono animali stagionali e ciò comporta un notevole cambio delle caratteristiche dei testicoli durante l'anno ma gli stalloni producono spermatozoi indipendentemente dalla stagione. Il massimo sviluppo e funzione si verifica nei mesi di maggio, giugno e luglio, mentre da settembre a febbraio regrediscono e da novembre a gennaio sono di dimensioni e funzioni minime. Altre variazioni sono legate all'età, infatti, vi è una riduzione nella produzione giornaliera di spermatozoi e una variazione del numero delle singole componenti.

### 1.1.2 EPIDIDIMO

Successivamente alla penetrazione nella tonaca albuginea, ogni tubulo si fonde con un dotto deferente che sfocia nel dotto epididimale che termina nel collicolo seminale ed è lungo circa 45m. L'epididimo è composto anatomicamente da tre parti quali testa, corpo e coda. La testa è la sede di maturazione degli spermatozoi posta sul polo capitato del testicolo in continuità con la rete testis tramite i dotti efferenti e adesa al testicolo tramite il legamento della testa dell'epididimo. Il corpo è la sede della motilità degli spermatozoi, delimitato dal margine epididimale del testicolo con seno epididimale ed è adesa in modo lasco alla superficie dorsale del testicolo. La coda funge da serbatoio di spermatozoi, si

continua con il dotto deferente ed è adeso al polo caudato del testicolo tramite il legamento proprio del testicolo. L'epididimo, quindi, ha un ruolo di stoccaggio degli spermatozoi che mentre lo attraversano maturano e si capacitano. La sua muscolatura li spinge nel dotto deferente durante la fase preliminare di eiaculazione.

### 1.1.3 GHIANDOLE ACCESSORIE

Le ghiandole sessuali accessorie sono ghiandole annesse alle vie genitali e al seno urogenitale e sono:

- ampolla del deferente;
- vescichette o ghiandole vescicolari;
- prostata;
- ghiandola bulbouretrale.

Le ghiandole sono responsabili della produzione delle secrezioni che contribuiscono alla porzione liquida e non cellulare del seme rilasciate nel lume dell'uretra pelvica. Le ampolle sono ingrandimenti del dotto deferente poste a livello dell'uretra pelvica e nello stallone sono ben sviluppate. Le ghiandole vescicolari sono ghiandole pari poste dorso-lateralmente al collo della vescica, rilasciano le secrezioni nell'uretra pelvica e presentano una parete muscolare con uno spazio collettore centrale. La prostata nello stallone è un'unica ghiandola nodulare solida divisa in due lobi stretti uniti da un sottile istmo trasversale ed è a forma di H. Le ghiandole bulbouretrali sono poste sulla superficie dorsale dell'estremità caudale dell'uretra pelvica vicino all'arco ischiatico e sono di forma ovoidale, piccole ed esternamente ricoperte dal muscolo bulbouretrale striato.

## 1.2 FISIOLOGIA ED ENDOCRINOLOGIA

Vi sono diverse componenti che influiscono fisiologicamente ed endocrinologicamente nella produzione del seme, quali:

- cellule del Sertoli;
- cellule del Leydig;
- epididimo;
- ghiandole accessorie;
- asse ipotalamo-ipofisi.

Ogni componente agisce diversamente tramite la produzione di ormoni e macromolecole durante le diverse fasi della spermatogenesi e l'eiaculazione.

### 1.2.1 CELLULE DEL SERTOLI

L'esatta funzione delle cellule del Sertoli non è ben nota ma si ritiene che svolgano un ruolo fondamentale e maggiore è il loro numero nel testicolo, più spermatozoi vengono prodotti. Le funzioni attualmente note sono:

- formazione barriera emato-testicolare tramite cui gli spermatociti primari migrano nella zona adluminale;
- supporto strutturale e nutrizionale delle cellule germinali;
- movimento delle cellule germinali in via di sviluppo all'interno dell'epitelio seminifero grazie alle componenti microtubulari e microfibrillari delle cellule del Sertoli;
- spermiatura con cui vengono liberati gli spermatidi maturi nel lume dei tubuli seminiferi e restano adesi alla porzione principale del citoplasma tramite un peduncolo;
- fagocitosi delle cellule germinali degenerate e corpi residui del citoplasma di spermatidi maturi;
- secrezione di proteine e fluidi che bagnano le cellule germinali e convogliano gli spermatozoi nei tubuli seminiferi della rete testis;
- comunicazione cellula-cellula tra le cellule germinali in via di sviluppo, lo strato cellulare mioide sottostante e le cellule del Leydig.
- produzione di lattato come fonte di energia, proteine di trasporto per ferro, rame, vitamina A ed ormoni per lo sviluppo delle cellule germinali e per la regolazione delle funzionalità dell'epididimo.

Vi sono due ormoni che determinano la funzione delle cellule del Sertoli, ormone follicolo stimolante (FSH) e testosterone, coadiuvati dal fattore di crescita dell'insulina (IGF), dal fattore di crescita epidermico (EGF) e il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Vi sono poi i polipeptidi mitogeni prodotti dalle cellule stesse che stimolano o coordinano le fasi della mitosi e della meiosi delle cellule germinali. Ogni specie presenta un numero specifico di cellule di Sertoli per ogni testicolo e ogni cellula può avere un numero massimo di cellule germinali ma solamente la prima caratteristica è determinata da un tratto ereditabile.

All'interno del testicolo le diverse generazioni di cellule germinali sono poste in uno specifico strato e differiscono per uno sviluppo pari a 12,2 giorni. Lungo la lamina propria del tubulo seminifero vi sono le cellule più giovani mentre quelle più vecchie sono poste in prossimità del lume tubulare. Lo sviluppo delle diverse generazioni delle cellule germinali avviene in un determinato lasso di tempo e determinano il ciclo dell'epitelio seminifero composto da otto fasi:

- stadio I che inizia con la completa scomparsa degli spermatidi maturi fino all'inizio dell'allungamento dei nuclei degli spermatidi;
- stadio II che inizia con la fine dello stadio precedente fino alla fine dell'allungamento dei nuclei degli spermatidi;
- stadio III che prevede l'inizio della prima divisione meiotica;
- stadio IV dove si ha il completamento della prima divisione meiotica e termina con la fine della seconda divisione meiotica;
- stadio V dove si ha la comparsa dello spermatogone di tipo B2;
- stadio VI che prevede l'allungamento di tutti i fasci degli spermatidi;
- stadio VII dove i fasci migrano fino al lume del tubulo seminifero e si ha scomparsa degli spermatogoni di tipo B2;
- stadio VIII dove gli spermatociti primari del preleptotene appaiono e gli spermatidi maturi che rivestono il lume tubulare scompaiono.

### 1.2.2 CELLULE DEL LEYDIG

Le cellule del Leydig provvedono alla secrezione di ormoni steroidei che permettono di regolare le funzioni dell'asse ipotalamo-ipofisi, delle ghiandole sessuali accessorie e dell'epitelio seminifero. Normalmente la produzione di ormoni è costante ma periodicamente le cellule ne aumentano la secrezione nell'arco della giornata determinando dei picchi, ciò è molto importante quando si tratta di valutare le concentrazioni di testosterone nel sangue in quanto potremmo avere dei valori estremamente variabili a seconda di quando è stato effettuato il prelievo di sangue.

A livello di reticolo endoplasmatico liscio e di mitocondri sono presenti gli enzimi coinvolti nella produzione dei diversi ormoni steroidei che consentono di dare il via alla steroidogenesi tramite la produzione di colesterolo de novo oppure tramite la scomposizione di lipoproteine a bassa densità di origine ematica. L'ormone luteinizzante (LH) provvede a stimolare la steroidogenesi grazie ai recettori

specifici presenti nella membrana plasmatica delle cellule del Leydig che, successivamente al legame con LH, consentono l'attivazione di una cascata che aumenta la quantità di colesterolo libero trasportato dai microfilamenti ai mitocondri.

Altro ormone che sembra essere prodotto dalle cellule del Leydig è l'ossitocina che agisce legandosi ai recettori presenti sulle cellule del Sertoli. Si è visto, inoltre, che determinano la contrattilità delle cellule mioidi peritubulari in modo tale da espellere il seme all'interno del lume del tubulo, hanno un ruolo nella spermiazione e una funzione autocrina nel controllo della steroidogenesi.

### 1.2.3 EPIDIDIMO

Tramite i dotti efferenti della rete testis, gli spermatozoi lasciano il testicolo e vengono trasportati, grazie alla contrazione della muscolatura liscia stimolata da vasopressina, ossitocina e  $PGF2\alpha$  all'interno della parete del dotto dell'epididimo, nei diversi tratti dell'epididimo composto da:

- dotto dell'epididimo;
- due o tre zone di maturazione a livello di testa e corpo dell'epididimo;
- una zona di stoccaggio degli spermatozoi fertili a livello di coda dell'epididimo.

All'interno dell'epididimo si ha la maturazione spermatica che consente agli spermatozoi di diventare fertili e, quindi, di poter fecondare l'ovulo grazie all'esposizione sequenziale ai fluidi epididimali prodotti in sostituzione del liquido, proteine ed altre sostanze derivanti dal testicolo che vengono riassorbiti a livello di dotti efferenti e della testa. Lo spermatozoo verrà considerato maturo quando avrà acquisito:

- capacità di fertilizzare l'ovulo;
- motilità progressiva;
- modifiche della struttura;
- caratteristiche specifiche della membrana plasmatica;
- metabolismo.

Al termine della sua maturazione, a livello di coda dell'epididimo, si avranno abbastanza spermatozoi per diversi eiaculati e la loro produzione è continua indipendentemente dalla frequenza dell'eiaculazione. Si suppone che alcuni stalloni eliminino gli spermatozoi in eccesso tramite la minzione mentre altri li



accumulano fino al limite massimo di distensibilità del dotto dell'epididimo causando però delle alterazioni strutturali agli spermatozoi.

L'epitelio dell'epididimo rilascia diverse proteine quali:

- lattoferrina;
- clusterina;
- procatepsina D;
- proteina di trasferimento del colesterolo (HE1/CTP);
- glutazione perossidasi (GPX);
- $\beta$ N-acetil-esosaminidasi;
- prostaglandina D2 sintasi (PDGS).

Tra queste le uniche di cui si è determinata una possibile funzione sono la lattoferrina, antiossidante e proteina di difesa posta a livello di cellule del corpo e della coda, e la transferrina, proteina legante il ferro e presente a livello di coda dell'epididimo. La prima sembra che sia secreta in risposta allo stimolo da parte di steroidi e si lega al seme per proteggerlo dai danni dello stress ossidativo, mentre la seconda è presente nel liquido seminale ma non si è ancora chiarito se abbia un ruolo nella fertilità dello stallone.

#### 1.2.4 GHIANDOLE ACCESSORIE

Le ghiandole accessorie sono le ghiandole che contribuiscono maggiormente nella formazione dell'eiaculato e, nonostante non si sappia esattamente quali siano i fattori esatti, si suppone che il pH intracellulare abbia un ruolo decisivo nella motilità. Ogni ghiandola concorre diversamente alla produzione del liquido seminale ma tutte dipendono dalla disponibilità di testosterone ematico. La ghiandola prostatica produce una secrezione acquosa e diluita che probabilmente aiuta a ripulire l'uretra durante l'eiaculazione. In base alla stagione e allo stallone, le ghiandole vescicolari producono una sostanza gelatinosa che compone la maggior parte del plasma seminale soprattutto durante la stagione riproduttiva. Infine, le due ghiandole bulbouretrali rilasciano una piccola quantità di secreto che andrà a comporre il seme.

#### 1.2.5 ORMONI ENDOCRINI

La funzione dell'apparato riproduttore maschile è controllata sia dal sistema nervoso autonomo e dal sistema neuroendocrino, quest'ultimo però ha il ruolo

principale nella sua regolazione tramite il rilascio di ormoni. Il sistema neuroendocrino è composto da ipotalamo, componente del diencefalo, ipofisi, posta ventralmente all'ipotalamo, adenoipofisi e neuroipofisi, immagazzina gli ormoni prodotti dal tessuto neurale. L'ormone prodotto dall'ipotalamo che consente il controllo della funzione riproduttiva è l'ormone di rilascio delle gonadotropine (GnRH), ciò avviene perché vi è un basso rilascio della melatonina secreta dalla ghiandola pineale. Il rilascio di GnRH avviene tramite brevi esplosioni pulsatili che stimolano l'adenoipofisi alla secrezione di gonadotropine, quali LH e FSH, che agiscono sulle gonadi stimolandone la funzione. Il rilascio pulsatile di LH, legandosi ai recettori di membrana delle cellule del Leydig, consente la produzione da parte del testicolo di estrogeni e testosterone, quest'ultimo viene a sua volta rilasciato nel circolo ematico per raggiungere l'ipotalamo e l'adenoipofisi. Grazie a ciò si ottiene la regolazione del rilascio di GnRH e LH da quest'ultimi e, di conseguenza, un feedback negativo circolare. A differenza di LH, il rilascio di FSH è meno dipendente dalla produzione di GnRH ed agisce sulle cellule del Sertoli che producono inibina ed attivina, ormoni proteici regolatori la secrezione di FSH da parte dell'adenoipofisi senza avere effetti sul rilascio di LH, estrogeni, proteina legante gli androgeni (ABP), transferrina, fattore di crescita insulino-simile-1 (IGF-1) ed altri fattori necessari per la spermatogenesi.

Altri ormoni endocrini che agiscono sull'apparato riproduttore sono:

- prolattina;
- ormone tiroideo;
- ormone della crescita.

Il primo di questi è un ormone proteico sintetizzato dai lattotrofi a livello di ipofisi anteriore e agisce sui tessuti sensibili agli androgeni. Inoltre, in associazione con LH e GH controlla l'esposizione dei recettori per l'LH a livello dei testicoli consentendo la sintesi degli androgeni. Si è notato che l'andamento dei livelli di quest'ormone varia in base alla stagione e aumenta in base all'età dello stallone.

Gli ormoni tiroidei, tiroxina (T4) e triiodotironina (T3), vengono prodotti dalla tiroide e sono a base di tirosina. Inoltre, rivestono un ruolo essenziale per la differenziazione delle cellule del Leydig e del Sertoli. L'ormone tiroideo agisce, a livello di cellule del Leydig, sulla proteina steroidogenica regolatoria acuta

(STAR) che consente il trasporto del colesterolo attraverso la membrana mitocondriale esterna. Nelle cellule del Sertoli, invece, induce il rilascio di lattato e l'espressione dell'mRNA della sostanza inibente mulleriana, dell'aromatasi, del recettore di estradiolo e della proteina legante gli androgeni.

GH è un ormone proteico prodotto e secreto dalle cellule somatotrope dell'ipofisi anteriore e agisce sui testicoli regolando la sintesi degli steroidi gonadici e della gametogenesi. Inoltre, è un mediatore per il rilascio di LH ed IGF-1.

### 1.2.6 EIACULAZIONE

Normalmente con il termine eiaculazione si intende un processo che prevede tre fasi consecutive quali:

- erezione che prevede l'allungamento e l'irrigidimento del pene grazie all'afflusso di sangue all'interno dei corpi cavernosi e del corpo spongioso del pene;
- emissione che consiste nel movimento e deposizione di spermatozoi e liquidi derivanti a dotto deferente, coda dell'epididimo e ghiandole accessorie nell'uretra pelvica;
- eiaculazione che consente l'effettivo rilascio del seme tramite l'uretra.

Per dare il via a questo processo è necessario che avvenga una stimolazione sensoriale del glande oppure psichica della corteccia cerebrale grazie agli stimoli visivi, quali posizione, animale teaser o manichino. Gli impulsi parasimpatici attraversano la porzione sacrale del midollo spinale per giungere al pene tramite i nervi splanchnici. Questa stimolazione consente la dilatazione delle arteriole e un maggior afflusso di sangue ai corpi cavernosi e al corpo spongioso. Allo stesso tempo, i muscoli ischiocavernoso, bulbospongioso ed uretrale si contraggono comprimendo le vene profonde e dorsali del pene verso l'arco ischiatico e permettono di evitare il ritorno venoso. L'emissione, stimolata da impulsi simpatici, e l'eiaculazione, determinata da una stimolazione parasimpatica, avvengono grazie a forti contrazioni pulsatili dei muscoli bulbospongioso ed uretrale così da rilasciare più getti di seme.

## 1.3 SPERMATOGENESI

La spermatogenesi prevede i processi di divisione e differenziazione cellulare con cui gli spermatozoi vengono prodotti nei tubuli seminiferi del testicolo. La durata di ogni

ciclo è determinata dal tempo tra ogni rilascio consecutivo di spermatozoi data dagli spermatogoni che subiscono il processo. Per quanto riguarda lo stallone, la durata approssimativa della spermatogenesi è di 57 giorni. È possibile suddividere il ciclo in onde spermatogene, cioè l'ordine sequenziale dei diversi stadi lungo i tubuli seminiferi in un determinato momento. Queste onde comportano un meccanismo che consente di:

- assicurare un rilascio costante di spermatozoi;
- diminuire la competizione tra ormoni ed enzimi presenti in un determinato stadio;
- limitare la congestione tubulare che si creerebbe se la spermiogenesi avvenisse contemporaneamente lungo l'intero tubulo;
- garantire un flusso costante di liquido tubulare in modo tale da avere il mezzo di trasporto per gli spermatozoi.

Tra i vari fattori da considerare durante questo processo, la temperatura ha un ruolo fondamentale in quanto in condizioni di freddo o di caldo sono dannosi; altri fattori che causano danni sono radiazioni, farmaci, carenza di vitamina A, dieta limitata e sostanze tossiche.

Durante la prima fase si ha la divisione per mitosi da parte degli spermatogoni, cellule staminali che rivestono la base dei tubuli seminiferi, in modo tale da mantenere il loro numero e produrre spermatociti primari. Quest'ultimi subiscono una divisione meiotica che consente la duplicazione dei cromosomi in modo da ottenere spermatidi aploidi che successivamente si differenzieranno in spermatozoi senza dividersi. Gli spermatozoi verranno poi rilasciati nel lume dei tubuli seminiferi che compongono la maggior parte del testicolo e presentano due cellule somatiche parenchimali, cellule mioidi e cellule di Sertoli, e tre tipi di cellule germinali, quali spermatogoni, spermatociti e spermatidi. Inoltre, si ha una diversa durata di vita delle cellule germinali che si sviluppano durante la spermatogenesi e ciò consente di dividerla in tre fasi quali:

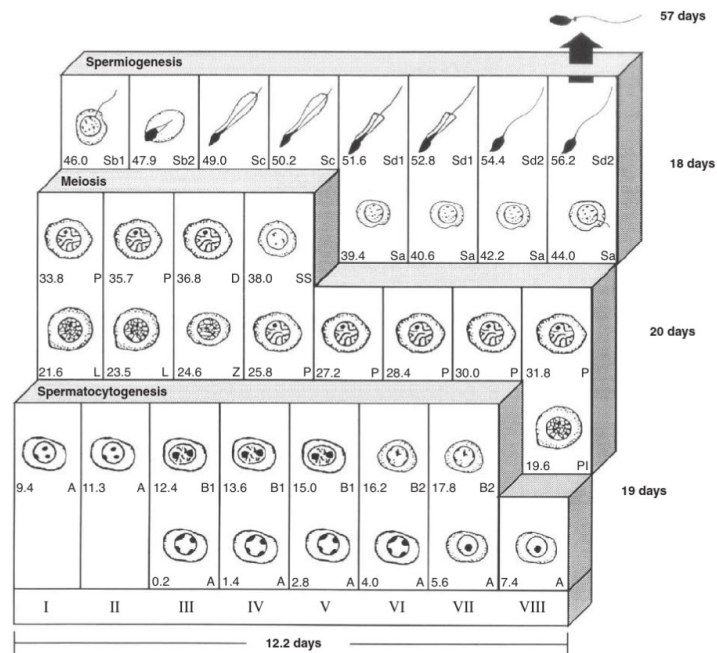
- spermatocitogenesi, dove avviene la mitosi degli spermatogoni;
- meiosi degli spermatociti;
- spermiogenesi degli spermatidi.

Durante la seconda fase si ha la meiosi dove si hanno due divisioni e lo scambio di materiale genetico tra cromosomi omologhi. Nella prima divisione abbiamo la separazione dei cromosomi paterni duplicati da quelli materni anch'essi duplicati consentendo il sessaggio dello spermatocita secondario; quindi, avremo che ogni spermatide contiene solo i cromosomi materni oppure solo quelli paterni.

Successivamente si ha la seconda divisione con cui si ottengono gli spermatidi aploidi che determinano l'inizio della spermiogenesi che consente la differenziazione senza divisione degli spermatidi sferici in spermatozoi rilasciati in seguito nella superficie libera luminale dei tubuli seminiferi. Mentre il fluido scorre attraverso il lume dei tubuli seminiferi fino ai tubuli della rete testis, gli spermatozoi vengono rimossi idrostaticamente. I tubuli della rete testis consentono lo sbocco degli spermatozoi dal testicolo nei dotti efferenti ed epididimo dove verranno maturati e conservati.

### 1.3.1 LO SPERMATOZOO

Lo spermatozoo è formato da una testa e una coda che nello stallone è abassiale per il 40-60% di cellule. La testa è occupata per la maggior parte dal nucleo e contiene il materiale genetico che servirà durante la fecondazione. Sulla superficie anteriore del nucleo si trova l'acrosoma che contiene gli enzimi idrolitici che consentono la penetrazione dello spermatozoo nell'ovulo. La membrana acrosomiale include una cresta apicale, un segmento principale e dei segmenti equatoriali. La coda si attacca alla testa tramite la regione del collo e a livello centrale vi sono i mitocondri necessari alla produzione di ATP. Nella zona terminale vi è una guaina fibrosa che dona flessibilità allo spermatozoo. A livello di coda è presente un assonema che la percorre nella sua interezza e termina alla sua estremità, mentre nella porzione mediale e terminale vi sono nove fibre dense. La regione del collo è posta alla base della testa e presenta dei centrioli, uno prossimale e uno distale che dà origine all'assonema durante lo sviluppo della coda. L'assonema è composto da nove doppiette di microtubuli e una coppia centrale e prosegue lungo la coda fino alla porzione terminale, a sua volta composta solamente dalla membrana plasmatica e da microtubuli in numero decrescente. Gli spermatozoi, quando vengono rilasciati dai tubuli seminiferi, non sono maturi nella maggior parte delle specie e necessitano di variazioni morfologiche e fisiologiche nell'epididimo per diventare motili e fertili.



**Fig. 3** Tre principali fasi della spermatogenesi, quali spermatocitogenesi, meiosi e spermogenesi.

### 1.3.2 SPERMATOGONI (SPERMATOCITOGENESI)

Gli spermatogoni derivano da gonociti posti nei precursori dei tubuli seminiferi e nell'adulto si posizionano nella regione periferica dei tubuli. Durante la spermatocitogenesi gli spermatogoni subiscono diverse divisioni mitotiche che portano alla formazione di due tipi di cellule:

- cellule staminali che sostituiscono le cellule germinali più avanzate o che subiscono la regressione stagionale;
- spermatociti primari prodotti da divisioni mitotiche di tipo proliferativo e/o differenziativo.

Nello stallone abbiamo cinque tipi di spermatogoni aventi caratteristiche diverse:

- piccolo nucleo appiattito (A1);
- grande nucleo con centri composti da euromatina (A2);
- nucleo ancora più grande e con un grande nucleolo oppure grandi frammenti di nucleolo (A3);
- grande nucleo con forma sferica o ovale e grandi pezzi di cromatina (B1 o intermedio);
- piccolo nucleo e frammenti piccoli di cromatina (B2) che dividendosi porterà alla formazione di spermatociti primari del preleptotene.

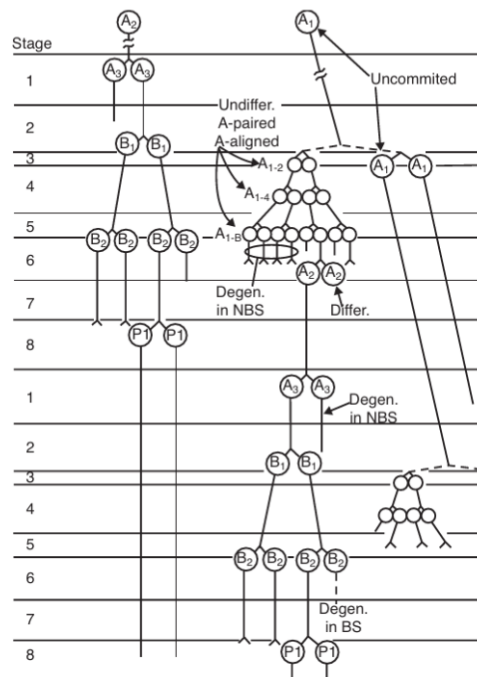
Ogni sottotipo è presente in una determinata sezione trasversale dei tubuli seminiferi che varia durante le fasi del ciclo spermatogenico e della stagione riflettendo la loro attività mitotica e degenerazione. Durante il normale periodo riproduttivo dello stallone, il numero totale di spermatogoni per ogni testicolo e il numero di spermatogoni B2 ottenuti per ogni spermatogonio A1 è maggiore rispetto al periodo non riproduttivo ma l'eccessiva quantità comporta inevitabilmente una degenerazione dell'eccedenza. Nonostante questa disparità, questo meccanismo consente di ottenere un numero gestibile di spermatoцити e spermatoиди. Considerando una durata del ciclo di dodici giorni, avremo un numero di spermatogoni determinato da:

- numero di cellule staminali per testicolo;
- schema di rinnovamento delle cellule staminali;
- numero di divisioni cellulari partendo dalla cellula staminale per arrivare allo spermatoцита primario;
- quantità di sottotipi di spermatogoni che degenerano.

Tra le varie cellule germinali sono presenti delle giunzioni intracellulare che consentono di facilitare lo sviluppo sincrono o la degenerazione, la produzione di spermatogoni, la differenziazione in spermatoиди aploidi aventi un solo cromosoma sessuale e/o la fagocitosi e conseguente digestione dei corpi residui ottenuti dalla produzione di seme.

### 1.3.3 SPERMATOCITI (MEIOSI)

La meiosi avviene nelle cellule germinali delle gonadi e consente lo scambio del materiale genetico tra cromosomi omologhi producendo spermatoиди aploidi. Gli spermatoцити primari sono ottenuti dalla divisione mitotica di spermatogoni B2 e si differenziano, senza dividersi, mutando il loro aspetto e la loro funzione. I cambiamenti maggiormente evidenti sono relativi alle dimensioni del nucleo e all'aspetto della cromatina che si organizza in fini filamenti. Il processo inizia con la prima meiosi da parte degli spermatoцити primari del preleptotene che, passando per le varie fasi quali metafase, anafase e telofase, porta alla formazione di spermatoцити secondari del leptotene. Segue poi la seconda meiosi al cui termine avremo gli spermatoиди che contengono un numero aploide di cromosomi (Fig. 4).



**Fig. 4** Schema di rinnovamento delle cellule staminali equine.

#### 1.3.4 SPERMATIDI (SPERMIOGENESI)

Durante la spermiogenesi avviene la differenziazione morfologica degli spermatidi in spermatozoi e che comporta una variazione da cellule sferiche con nuclei sferici in cellule che presentano:

- una testa aerodinamica con un nucleo condensato provvisto di genoma maschile;
- un acrosoma, cioè una vescicola contenente enzimi penetrativi;
- una coda che determina motilità.

In questa fase la sintesi del DNA è minima e si ha, invece, un cambiamento nel contenuto di arginina e cistina e nel numero di legami disolfuro a livello di cromatina. La spermiogenesi è composta da diverse fasi quali:

- fase del Golgi;
- fase del capsido;
- fase di allungamento,
- fase di maturazione.

Nella fase del Golgi gli spermatidi presentano un prominente apparato del Golgi che produce delle vescicole a livello di membrana. A loro volta si uniscono in un'unica vescicola acrosomica adiacente al nucleo che si differenzia nell'acrosoma del futuro spermatozoo. I centrioli migrano a livello di involucro



nucleare dando origine all'assonema che si svilupperà; durante la crescita viene eiettato verso il lume allontanandosi da nucleo. A livello di fossa articolare vi è l'envelope nucleare rientrato da cui si sviluppa il flagello. La membrana plasmatica dello spermatoide si ripiega a formare un tubulo detto canale flagellare che consente al flagello di crescere estendendosi verso il lume partendo dall'anulus, posto appena al di sotto dell'attacco del flagello al nucleo. Inoltre, può facilitare la flagellazione minuta assicurando il contatto con la membrana nucleare quando avviene l'attaccamento del flagello al nucleo così da incanalare la richiesta di ATP nella porzione centrale dove vengono attirati i mitocondri. In alternativa, durante lo sviluppo delle diverse strutture, il canale flagellare impedisce ai mitocondri di attaccarsi all'assonema o alle fibre dense.

Il processo prosegue con la fase del capsido dove avremo un appiattimento e l'inizio della diffusione della vescicola acrosomiale per formare una copertura sul nucleo. Avremo uno spostamento dell'apparato di Golgi che diventa sempre meno evidente allontanandosi dall'acrosoma mentre si ha l'opposto per lo sviluppo flagellare. Inoltre, il nucleo risulta ancora sferico.

Avremo poi la fase di allungamento dove il nucleo inizia ad allungarsi a mano a mano che il capsido si estende. Negli spermatozoi è presente un organello transitorio, detto "manchette", composto da microtubuli collegati tra loro con bracci all'interno di una guaina formata attorno alla metà inferiore del nucleo allungato e che si estende all'esterno del flagello che si sta sviluppando.

Mentre gli spermatozoi procedono nel loro sviluppo vengono incorporati in profondità nel citoplasma delle cellule del Sertoli. Nello stallone, come nelle altre specie, lo spermatozoo non conserva la manchette che rimane nel corpo residuo rilasciato nello sperma e degenera.

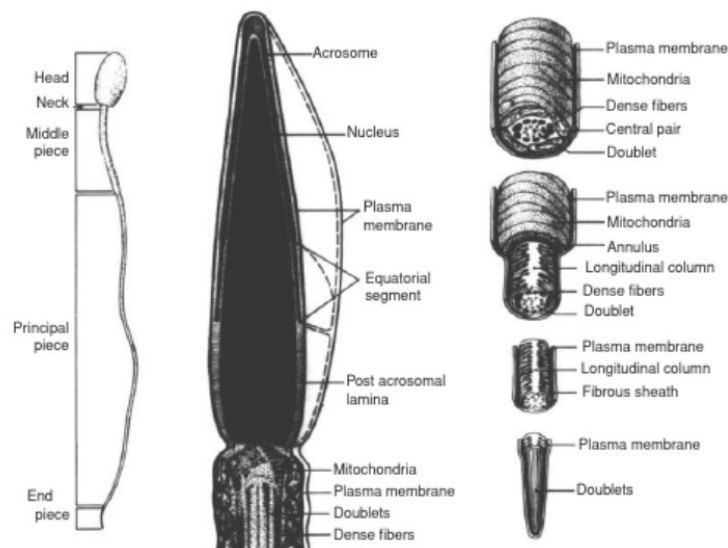
La fase finale prevede la migrazione della manchette al polo caudale dello spermatoide dove fornirà un fusto che sostiene il canale flagellare e consente libertà di movimento. La dissoluzione della manchette corrisponde alla migrazione dell'anulus nella sua sede permanente posta tra la porzione centrale dello spermatozoo e la zona dove vi è l'accorciamento e la scomparsa del canale flagellare. Successivamente a ciò avremo lo spostamento dei mitocondri attorno al flagello.

La guaina fibrosa è formata da due colonne adese a venature che si estendono lungo la porzione principale tra le fibre dense esterne e la membrana

citoplasmatica. La spermiiazione è il processo che prevede il rilascio di spermatidi dall'epitelio seminifero come singoli spermatozoi. A livello di regione del collo lo spermatide è adeso al suo corpo residuo tramite fusti citoplasmatici e una piccola porzione rimane come gocciolina citoplasmatica. Al termine della spermiiazione, si forma il corpo residuo che ha origine da una grande frazione di citoplasma all'interno dello spermatide; il corpo residuo verrà successivamente fagocitato e digerito dalle cellule del Sertoli, nonostante sembra che avvenga un'auto degradazione all'interno del corpo stesso grazie all'azione lisosomiale.

## 1.4 FUNZIONE DEGLI SPERMATOZOI

Gli spermatozoi sono composti da testa, collo, porzione centrale, porzione principale e porzione terminale. Se si deve fare una valutazione degli spermatozoi considerandone l'utilizzo nell'inseminazione artificiale (IA), sia per la refrigerazione che per il congelamento, è bene focalizzarsi sul nucleo altamente condensato e le strutture microtubulari, fibrose e membranose in quanto rispondono diversamente allo shock da freddo e hanno un ruolo rilevante nella motilità.



**Fig. 5** Struttura spermatozoo

### 1.4.1 MEMBRANA PLASMATICA

La membrana plasmatica è la componente dello spermatozoo più esterna che lo riveste completamente ma in base alla regione varia la sua natura e funzione.

Indipendentemente dalla zona presa in considerazione, è costituita da:

- doppio strato fosfolipidico;
- interfaccia fosfolipidi-acqua;
- glicocalice.

Il primo strato è formato da fosfolipidi polari provvisti di catene aciliche idrofobiche orientate internamente e gruppi di teste polari idrofile e cariche rivolte esternamente, verso l'acqua (solvente polare). I principali lipidi presenti sono fosfolipidi e colesterolo mescolati con le proteine che possono essere:

- integrali, cioè essenziali per la struttura della membrana, e alcune sono pori o canali oppure recettori di superficie;
- periferiche, cioè associate alla membrana ma facilmente rimovibili.

Inoltre, si è visto che, per quanto riguarda i lipidi, il contenuto di colesterolo non differisce solo tra specie, ma anche tra singoli maschi all'interno di una specie e tra individui eiaculati di un singolo maschio (Gadella et al., 2001).

Molte proteine di superficie sono provviste di catene laterali di carboidrati carichi negativamente così da attrarre e legare le proteine che circondano lo spermatozoo. I principali fosfolipidi presenti sono colina, etanolamina e sfingomieline e sono disposti lungo la membrana in modo lamellare così da muoversi lateralmente nel doppio strato. La temperatura corporea, il rapporto tra fosfolipidi e colesterolo e la natura del fosfolipide stesso garantiscono la fluidità di membrana. In situazioni dove vi è una riduzione della temperatura, i lipidi si trasformano in cristalli e le proteine si aggregano causando instabilità di membrana e possibili danni irreversibili. Prima e dopo l'eiaculazione, la membrana plasmatica subisce diversi cambiamenti, tra cui l'integrazione dei lipidi, l'alterazione del grado di saturazione degli acidi grassi e, negli stalloni, una perdita di colesterolo che si traduce in una marcata diminuzione del rapporto colesterolo/fosfolipidi (Gadella et al., 2001). Inoltre, la composizione e l'organizzazione laterale della membrana plasmatica regola la sua affinità per i fattori di adesione, la sua permeabilità ai soluti idrofili e il suo ruolo negli eventi di segnalazione cellulare e fusione cellulare (Gadella et al., 2001). Vi sono, infine, tre aree che consentono di ancorare la membrana plasmatica alle strutture sottostanti e sono:

- anello caudale della testa;
- anello;
- porzione principale.

#### 1.4.2 TESTA

La testa dello spermatozoo è composta da:

- nucleo provvisto di involucro che determina la forma della testa;
- acrosoma;
- lamina post-acrosomiale;
- membrana plasmatica.

Nello stallone, il nucleo è largo e piatto, contiene cromatina altamente condensata ed è racchiuso all'interno di un involucro nucleare a doppio strato con pochi pori. L'acrosoma è posto nella porzione rostrale del nucleo e contiene glicolipidi ed enzimi. La faccia esterna acrosomiale, a livello del segmento equatoriale, è solamente fusogena e si fonde con la membrana plasmatica durante la reazione acrosomiale. Il confine tra la membrana plasmatica che ricopre l'acrosoma e quello caudale all'acrosoma è noto come segmento equatoriale (Flesch et al., 2000), sprovvisto di enzimi e si fonde con la membrana dell'ovocita. La lamina post-acrosomiale riveste l'anello posteriore, il segmento equatoriale e la porzione caudale. La membrana plasmatica e l'involucro nucleare si fondono a livello di anello. La testa è adesa al collo tramite la fossa d'impianto rivestita da un doppio strato ispessito a formare una placca basale ma non è così robusta e nello stallone è spesso decentrata e determina la presenza di una coda abassiale.

#### 1.4.3 COLLO

Il collo è composto da:

- porzione di connessione provvisto di capitulum e colonne segmentate;
- centriolo prossimale;
- mitocondri;
- envelope nucleare ridondante.

Le colonne segmentate presenti sono nove e formate ognuna da quindici strutture composte da proteine fibrose sovrapposte. Ognuna presenta una colonna segmentata principale formata da due coppie di colonne fuse insieme per quasi tutta la loro lunghezza, le rimanenti sono dette colonne segmentate minori.

Le colonne principali presentano forme diverse, quella primaria si piega dando origine all'area maggiore del capitulum che consente l'adesione con la piastra basale della testa. Diversamente dalla precedente, l'altra colonna segmentata principale presenta due pile di piastre che si fondono insieme solamente

rostralmente al centriolo. Il capitulum assieme alle due colonne segmentate principali vanno a formare un'articolazione allungata e continua. Le colonne minori, invece, si ripiegano fondendosi ventralmente e dorsalmente alla zona del collo.

Nello stallone, il centriolo prossimale assieme alla porzione di connessione formano la zona in cui viene dato il via al movimento della coda negli spermatozoi maturi.

L'envelope nucleare ridondante ha origine dalla parte in eccesso dell'envelope nucleare durante la condensazione del nucleo dello spermatide e una successiva diminuzione del volume nella spermiogenesi.

#### 1.4.4 SEGMENTO INTERMEDIO, PRINCIPALE E TERMINALE

Il segmento intermedio si sviluppa dalla porzione caudale del collo tramite l'anulus ed è provvisto di mitocondri distribuiti lungo una circonferenza a doppia spirale continua. Ogni giro presenta una fibra densa dura che si sviluppa lungo tutto il segmento intermedio e per la maggior parte del segmento principale. Ogni fibra fornisce rigidità smorzando l'arco di battuta flagellare e si assottiglia nella parte caudale del segmento principale per scomparire all'estremità.

L'elemento che consente la propulsione di uno spermatozoo è l'assonema costituito da una coppia centrale di microtubuli accerchiati da nove doppietti.

Ogni doppietto presenta un microtubulo cilindrico A con due file longitudinali di braccia orientate verso il doppietto successivo e un microtubulo B a forma di C. I microtubuli sono provvisti di tubulina mentre nelle braccia è presente la dineina ricca di ATPasi che traduce l'energia in movimento meccanico. Tra i doppietti vi sono i legamenti nexin, che consentono di mantenere la simmetria e coordinano il movimento dei doppietti quando scorrono e si contraggono.

Al termine del segmento intermedio vi è l'anello, struttura densa di elettroni e zona in cui la membrana plasmatica è saldamente adesa.

A livello di segmento principale si ha un proseguo delle fibre dense e dell'assonema ma ciò che lo caratterizza sono le fibre di guaina brous provviste di nervature fibrose e le colonne longitudinali. Proseguendo caudalmente si nota che la guaina fibrosa si avvicina all'assonema e le fibre dense si riducono. La guaina fibrosa consente una maggiore flessibilità determinando un'efficace traslazione

durante il movimento di scorrimento e contrazione dei doppietti e garantendo un supporto strutturale.

Infine, nel segmento terminale si ha un proseguo dei doppietti e della coppia centrale dell'assonema ma all'estremità caudale si viene a perdere.

#### 1.4.5 MOTILITÀ SPERMATICA

Uno spermatozoo è in grado di muoversi in avanti grazie alla flessione del flagello, consentita da onde di flessione coordinate che si propagano dal collo.

Questo movimento è consentito grazie a due sistemi:

- filamenti soccorrevoli all'interno dei doppietti che consentono di generare la forza per l'onda di flessione;
- controllo che consente di regolare lo scorrimento e il battito flagellare.

Inoltre, vi sono delle forze attive nella coda che si oppongono ai legami di nexin, ai raggi, alle fibre dense e alla guaina fibrosa. Altro fattore importante da considerare è la viscosità del mezzo in cui sono gli spermatozoi che altera la frequenza del battito e la curvatura del flagello.

Per consentire lo scorrimento è necessario che vi sia ATP, cAMP e i bracci di dineina. La presenza di tutte queste componenti consente al braccio di dineina di staccarsi dal microtubulo B ed accorciarsi per poi riattaccarsi al microtubulo in un nuovo sito con un'inclinazione di circa 40°. Successivamente si avrà una contrazione e il ritorno del braccio di dineina nella sua posizione di partenza andando a generare una forza di scorrimento tale da muovere il secondo doppietto verso la punta dell'assonema e oltre il primo.

Nel caso in cui lo spermatozoo ruoti lungo il proprio asse, si ha un battito elicoidale della coda dato da una lieve torsione in contemporanea ad un movimento di flessione lungo il segmento principale. La causa di ciò è un'attivazione sfasata dei bracci di dineina grazie all'azione del  $\text{Ca}^{2+}$  che esercita la sua azione tramite la calmodulina. In considerazione di ciò, se dovessero venire a mancare la corretta concentrazione intracellulare di cAMP, la sintesi di ATP e il sistema  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, lo spermatozoo non sarebbe in grado di iniziare e/o mantenere la propria motilità.

## 1.5 ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGIES (ART)

L'utilizzo dell'inseminazione artificiale nelle diverse specie animali si basa su tre fondamenti:

- gli spermatozoi sono in grado di sopravvivere nell'ambiente esterno;
- è possibile reintrodurre il seme nelle femmine ottenendo un tasso di concepimento accettabile;
- è possibile identificare il momento in cui la femmina è fertile.

Nella maggior parte delle specie, si effettua una valutazione del seme basata sul numero di spermatozoi, la loro motilità e la loro morfologia. Normalmente dopo il prelievo, il seme viene addizionato ad un extender e refrigerato o congelato. Per quanto riguarda la specie equina l'ART consente:

- un migliore e più efficiente uso dello stallone;
- di coprire più fattrici in tutto il mondo;
- maggiore sicurezza sull'integrità dello stallone e della fattrice;
- l'assenza di trasmissione di patologie veneree grazie ai test eseguiti per poter effettuare la monta;
- di aumentare la fertilità di alcuni maschi tramite gli extender;
- di tarare la dose inseminante eliminando il plasma seminale che può ridurre la motilità spermatica;
- di diminuire il rischio di lesioni per il maschio;
- di visionare in tempo reale la qualità del seme.

### 1.5.1 METODOLOGIE DI RACCOLTA DEL SEME

Indipendentemente dalla specie è fondamentale tenere l'eiaculato lontano da calore e dalla luce diretta del sole durante e dopo la raccolta. Nello stallone la metodica utilizzata maggiormente per il prelievo prevede l'uso di una vagina artificiale, altre metodiche quali il prelievo dalla vagina della cavalla o direttamente dall'uretra dello stallone post eiaculazione non sono attuabili in quanto il seme viene rilasciato direttamente in utero e la seconda metodica consente solo un'analisi qualitativa. Per il prelievo del seme si può utilizzare un manichino dove lo stallone monta oppure effettuare la raccolta a terra e una vagina artificiale (AV), aperta o chiusa, utilizzata per la raccolta del seme. Di base tutte le AV presentano una struttura esterna rigida di cuoio o plastica che

racchiude al suo interno una doppia camera cilindrica in lattice che viene riempita d'acqua a 42°C circa. Nella porzione terminale viene avvitato un contenitore per la raccolta del seme, provvisto di un filtro di nylon se non viene messo all'interno dell'AV oppure se la filtrazione avviene dopo la raccolta con una garza. Spesso all'interno della AV viene inserito un rivestimento sterile monouso che consente di ridurre al minimo il rischio di contaminazione crociata, ma non è detto che sia ben tollerato dallo stallone. Per quanto riguarda il prelievo in sé, è possibile utilizzare una cavalla in estro, immobilizzata con le balzane e il torcinaso, oppure un manichino che richiederà la presenza o l'urina di una cavalla in estro per eccitare lo stallone. Prima di procedere con il prelievo è bene pulire la verga con acqua tiepida, controllare che non vi siano lesioni, secrezioni anomale o aree infiammate e regolare la pressione interna della AV. L'operatore che preleva il seme è posto dallo stesso lato di chi porta lo stallone e quando l'animale salta sul manichino provvede ad inserire la verga nella AV che avrà un'angolazione e un movimento ottimale per il prelievo. All'inizio dell'ejaculazione si osservano i primi getti di seme associati al movimento a pompa della coda dello stallone detto flagging e al termine si sfilava la AV mentre lo stallone smonta dal manichino. Infine, avremo l'ejaculato da valutare e con cui preparare le dosi inseminanti.

#### 1.5.2 VALUTAZIONE DEL SEME

Si effettua un prelievo del seme per valutarne principalmente la qualità in quanto la valutazione della quantità giornaliera di sperma prodotto atto a garantire un normale esito post accoppiamento si basa sulla circonferenza e la lunghezza dello scroto. Quando si valuta la qualità degli spermatozoi è bene considerare che sono fortemente influenzati da diversi fattori, quali:

- freddo, l'improvviso abbassamento della temperatura al di sotto dei 30°C;
- caldo, l'aumento repentino al di sopra dei 40°C;
- pH, variazioni dettate da contaminazione dell'urina;
- acqua e diluenti seminali conservati o preparati in modo non adeguato.

Per prevenire eventuali problematiche è bene che, in qualsiasi momento, qualunque cosa entri in contatto con il seme sia caldo, asciutto e non presenti polvere, muffe o sostanze chimiche. È bene utilizzare un microscopio che consente di regolare la temperatura tra i 35° e 37°C del tavolino portaoggetti, sia provvisto di un'ottica di buona qualità e di obiettivi 4x, 10x, 40x e 100x. Dopo



aver ottenuto il campione si procede con l'ispezione per identificare la presenza di urina, sangue fresco o degenerato, pus, sporcizia, feci e smegma. È possibile, inoltre, fare una stima della concentrazione degli spermatozoi sulla base del colore e raramente si ha azoospermia, meglio effettuare un secondo prelievo per averne la conferma.

I parametri che vengono presi in considerazione durante la valutazione del seme sono:

- densità;
- carica superficiale;
- caratteristiche morfologiche;
- motilità;
- integrità di membrana;
- proteine di membrana;
- frammentazione del DNA.

Di seguito verranno descritte solamente le caratteristiche prese in considerazione durante lo studio.

Il momento ottimale per valutare la motilità degli spermatozoi è pochi minuti dopo il prelievo del seme ma se ciò non è possibile è bene aggiungere un extender e conservarlo adeguatamente. La valutazione della percentuale di spermatozoi progressivamente motili si effettua posizionando una goccia di seme di circa 3mm di diametro su un vetrino preriscaldato coperta da un coprioggetto caldo. Se si ha un campione abbastanza concentrato è preferibile diluirlo con della soluzione salina tamponata con fosfato oppure una soluzione di citrato di sodio al 2,9%. Con ingrandimento a 10x o 40x si procede a stimare la motilità progressiva del campione che può essere:

- poor, se <30%;
- fair, se tra 30% e 59%;
- good, se  $\geq$ 60%.

A volte, se si esaminano maschi al di fuori della stagione riproduttiva o che non saltano regolarmente, possiamo avere un eiaculato con un numero elevato di spermatozoi morti ma con il prelievo successivo si hanno dei valori considerevolmente migliori. Inoltre, nei casi in cui l'attività di massa o la percentuale di motilità progressiva non corrispondono con i risultati ottenuti dalla

valutazione del contenuto scrotale è bene preparare un nuovo vetrino con lo stesso seme oppure effettuare un nuovo prelievo.

Altro parametro che si considera è la morfologia, particolarmente associato agli esiti degli accoppiamenti e considerato quasi sicuramente un tratto ereditabile. È importante effettuare una valutazione morfologica in quanto ci fornisce una misura della salute dei testicoli, degli epididimi e delle ghiandole accessorie. Inoltre, se si valuta un soggetto che vive in un ambiente sottoposto a estreme temperature ed umidità nelle diverse stagioni, piani di nutrizione e parassitosi, ci fornisce un'indicazione del livello di adattamento dell'animale.

Quando si deve effettuare una valutazione morfologica del seme, vi sono due metodi che vengono più frequentemente utilizzati:

- microscopia in campo chiaro del seme colorato con eosina nigrosina (NE);
- microscopia a contrasto di interferenza differenziale (DIC) o microscopia a contrasto di fase.

Con la prima metodica è possibile effettuare anche una stima di vivi e morti, dove i vivi essendo provvisti di una membrana cellulare intatta non assorbono l'eosina e appariranno bianchi mentre i morti avendo le membrane danneggiate appariranno con la testa completamente o parzialmente rosa.

La seconda metodica prevede l'uso di seme conservato ed è possibile valutarlo immediatamente o successivamente. I campioni necessitano la conservazione a 4°C per inibire la proliferazione batterica e l'aggiunta di un trattamento come la salina formale tamponata al 10% (BFS). Inoltre, consente una valutazione morfologica migliore per quanto riguarda l'esame dell'acrosoma e l'individuazione dei vacuoli nucleari.

L'interpretazione dei dati ottenuti con una delle due metodiche prevede l'analisi della percentuale di seme normale, se più del 30% del seme totale è anormale c'è il rischio di una riduzione della fertilità. È bene ricordare, però, che un esame della frequenza di determinate anomalie del seme permette di valutare la gravità ed a volte di identificare la possibile causa dell'anomalia. La classificazione delle diverse anomalie degli spermatozoi si basa su:

- sito dello spermatozoo, quale acrosoma, testa, porzione centrale o coda;
- possibile effetto sulla fertilità;
- possibilità di compensare o meno l'anomalia da parte del soggetto.

In conclusione, è possibile avere soggetti aventi un eiaculato con un unico tipo di anomalia in percentuale elevata probabilmente causata da un disturbo ereditario della spermatogenesi.

Per quanto concerne la stima della densità del campione, in campo si utilizza l'emocitometro che consente di stabilire il numero totale degli spermatozoi tramite il prodotto tra volume e densità. Nel caso in cui, invece, si hanno più campioni da analizzare è preferibile l'uso della spettrofotometria dove la densità ottica del seme viene comparata con la curva di calibrazione. In alternativa, è possibile utilizzare dei contatori elettronici di particelle ma le dimensioni piccole e la forma piatta delle teste degli spermatozoi non rendono semplice la conta delle cellule.

Infine, il parametro che viene valutato tramite HOS test oppure la colorazione supravital è la funzionalità di membrana in quanto è estremamente importante nel processo di fertilizzazione. Molti fattori influenzano la stima finale della performance riproduttiva negli studi negli allevamenti, come i diversi management utilizzati, l'età degli stalloni, numero di fattrici assegnate ad ogni stallone (dipendono dalla loro genetica e dalle precedenti performance sportive), la fertilità delle fattrici, etc. (Neild et al., 2000).

La colorazione supravital si basa sull'utilizzo di una colorazione sensibile alla fluorescenza data da carbossifluorescina acetato (CFDA) e propidio ioduro (PI). Questo metodo si basa sull'idrolisi dei CFDA da parte delle esterasi all'interno della cellula producendo carbossifluoresceina libera, che viene trattenuta quando la membrana plasmatica è intatta (Neild et al., 1998). Nel caso in cui la membrana risulti danneggiata, PI penetra all'interno dello spermatozoo e si lega al DNA. Per quanto riguarda il test HOS, invece, si ha una soluzione fatta con fruttosio, sucrosio, lattosio e sodio citrato che consente di valutare la funzionalità di membrana tramite le variazioni morfologiche delle code. I cambiamenti morfologici osservati negli spermatozoi equini dopo essere stati sottoposti a HOS test sono prodotti nella coda di quegli spermatozoi che possiedono membrane intatte (Neild et al. 1998). È bene ricordare che nel seme equino, l'alta permeabilità di membrana all'acqua può interferire con il risultato del test a causa del trasporto di quest'ultima attraverso la membrana porosa e ciò viene osservato nel seme congelato e successivamente scongelato. Il test HOS è un metodo di valutazione semplice e accessibile che, come in altre specie, potrebbe essere a

utile complemento all'analisi di routine del seme equino. Ha il vantaggio aggiuntivo di essere meno suscettibile agli effetti immediati dello shock da freddo e alla valutazione dei singoli spermatozoi rispetto alla popolazione nel suo insieme, così come la motilità progressiva (Neild et al., 1998).

Oltre a questi parametri che vengono normalmente analizzati per la valutazione del seme, vi sono dei test in vitro che permettono di studiare il contributo di componenti specifiche presenti nel seme successivamente alla sua deposizione nel tratto femminile. L'utilizzo di questi test consente di migliorare l'identificazione di maschi fertili ma anche dei soggetti che presentano una normale motilità e morfologia degli spermatozoi nonostante siano sterili o subfertili. I test comprendono:

- analisi computerizzata della motilità degli spermatozoi (CASA);
- fecondazione in vitro (IVF);
- componenti della IVF come l'attaccamento degli spermatozoi alla zona pellucida;
- valutazione integrità di membrana degli spermatozoi e funzionalità dei mitocondri tramite diversi fluorofori;
- valutazione dell'integrità cromatinica dello spermatozoo (SCSA) che determina la percentuale di spermatozoi con DNA denaturato;
- valutazione dell'acrosoma con colorazione Dip Quick e Spermac che consente di determinare se è intatto o reattivo.

Purtroppo, questi test non hanno dimostrato una stretta correlazione con la fertilità e non vengono normalmente utilizzati nella Breeding Soundness Evaluation (BSE). Inoltre, attualmente l'effettivo ruolo delle proteine plasmatiche seminali in rapporto alla fertilità non è stato ancora stabilito, nonostante gli enormi sviluppi relativi alla nostra conoscenza del peso delle proteine plasmatiche seminali per la sopravvivenza degli spermatozoi, la fecondazione e lo sviluppo embrionale precoce.

### 1.5.3 EXTENDER

Nella maggior parte delle specie domestiche il numero degli spermatozoi è di lunga superiore a quelli necessari per l'instaurarsi di una gravidanza, quindi, è possibile ottenere più dosi inseminanti da una singola eiaculazione se si diluisce il seme. È possibile stabilire il massimo grado di diluizione tramite il numero

minimo di spermatozoi e il volume della dose inseminante reputato fondamentale per ottenere un tasso di gravidanza ammissibile. Inoltre, è bene ricordare che questi fattori sono stabiliti dal punto di inseminazione, la sopravvivenza nell'extender degli spermatozoi e le idiosincrasie delle varie specie. Quando si deve stabilire il volume della dose inseminante bisogna considerare che deve essere adeguato al sito dove viene depositato e facilmente manipolabile. Nei mammiferi, se si aggiunge un diluente semplice nel seme, si ottiene un iniziale aumento della motilità da parte degli spermatozoi che viene rapidamente perso parallelamente all'aumento della Vital Stain. Si suppone che questo "effetto diluizione" comporti una perdita di vitalità cellulare tramite lisciviazione delle componenti strutturali della membrana cellulare. Nonostante in passato si temevano gli effetti dell'uso di extender, ad oggi si è visto che le proteine o l'alcol polivinilico eliminano l'effetto di diluizione.

La maggior parte degli extender è adatta per la conservazione refrigerata di seme per un periodo di tempo di circa 24-48 h. Oltre alla diluizione del plasma seminale, l'effetto positivo dell'extender si basa sul controllo del pH e dell'osmolarità, nonché sull'apporto di energia (Aurich et al., 2005).

Se il seme viene refrigerato e non crioconservato, il buffering diventa estremamente importante in quanto viene mantenuta una certa attività metabolica da parte degli spermatozoi. Molti dei diluenti utilizzati presentano come tampone principale l'agente che ne compone la maggior parte del volume mentre in altri sono il componente minore. Tra i vari buffer troviamo:

- citrato, semplice ed efficace;
- soluzione salina tamponata con fosfato, poco idoneo in quanto dispone all'agglutinazione testa a testa degli spermatozoi;
- tris(idrossimetil)amminometano, tampone organico più usato;
- proteine del latte scremato;
- tuorlo d'uovo;
- lecitine da piante;
- liposomi.

Negli ultimi anni si è vista una riduzione dell'uso di soluzioni di origine animale determinato dal possibile rischio di trasmissione di patologie.

La pressione osmotica del plasma seminale è di 285 mOsmol e ciò ha portato a preferire diluenti lievemente iperosmotici nonostante gli spermatozoi siano in

grado di sopportare un moderato range di tonicità. Si è visto però, che le proteine e, soprattutto, gli zuccheri hanno un ruolo rilevante oltre al nutrimento e alla funzione crioprotettiva. Normalmente gli zuccheri semplici utilizzati sono glucosio, fruttosio, mannosio e arabinosio, nonostante le diverse tempistiche di metabolizzazione tra le specie. Tra gli zuccheri da fonti di origine animale abbiamo il lattosio che non viene metabolizzato in misura rilevante e il tuorlo d'uovo che funge sia da soluzione tampone che da fonte energetica. Nonostante il substrato energetico sia poco rilevante nel caso in cui il seme venga congelato in quanto l'attività metabolica si arresta, se il seme viene refrigerato diviene estremamente importante per garantire la vitalità degli spermatozoi.

Quando si deve sottoporre il seme a refrigerazione è bene valutare attentamente il tipo di extender da utilizzare e, tra le varie opzioni, l'extender a base di acqua di cocco sembra essere un'alternativa per la conservazione del seme. Tuttavia, ci sono alcuni svantaggi, quali l'impossibilità di conservare per un lungo periodo l'acqua di cocco e la sua limitata disponibilità in alcune parti del mondo. Inoltre, la composizione chimica di ciascuna noce di cocco differisce e ciò può influire direttamente sulla capacità di conservazione degli spermatozoi da parte dell'extender (Brasileiro et al., 2019). Lo studio di Brasileiro e colleghi, precedentemente citato, ha mostrato che l'aggiunta di cocco in polvere non consente di ottenere differenze significative nel mantenimento dei parametri spermatici e i risultati sono stati simili a quelli ottenuti con extender commerciali ed extender con latte scremato o tuorlo d'uovo.

L'ultima componente che si considera quando si utilizzano gli extender sono gli antibiotici, utilizzati come profilassi per contrastare la trasmissione di patogeni e diminuire la carica microbica totale. Alcuni diluenti, come il tuorlo d'uovo, riducono l'efficacia di questi farmaci portando all'incubazione con cocktail di antibiotici prima di aggiungere l'extender. L'uso profilattico di queste sostanze ha portato a mettere in dubbio questa pratica per il forte rischio di sviluppo di antibiotico resistenza e a proporre metodiche per la rimozione di microrganismi contaminanti in fase di trattamento del seme.

#### 1.5.4 METODICHE DI CONSERVAZIONE DEL SEME

Le metodiche di conservazione del seme consentono di allungare la vita degli spermatozoi al di fuori dell'organismo e sono:

- refrigerazione;
- congelamento;
- sospensione dell'attività metabolica degli spermatozoi refrigerando il seme o conservandolo a temperatura ambiente.

Tra le varie metodiche elencate verrà affrontata solamente la refrigerazione in quanto è l'unica utilizzata all'interno dello studio.

Normalmente la riduzione della temperatura degli spermatozoi fino a 5°C, sia rapida che lenta, determina danni cellulari causando il fenomeno definito “shock da freddo” che comporta perdite di enzimi, lipidi, potassio intracellulare, colesterolo, adenosina trifosfato (ATP) e lipoproteine. Non è ancora ben noto come ciò incida nella funzione degli spermatozoi ma è risaputo che i fosfolipidi di membrana mutino il proprio stato da liquido a gel e, siccome ciò avviene a temperature diverse in base al tipo di fosfolipide, può condurre alla separazione di fase. A seguito di ciò, le proteine di membrana si agglomerano in modo irreversibile comportando la perdita di funzione e l'aumento della permeabilità al calcio. Inoltre, avremo delle membrane maggiormente fusogeniche determinando l'alterazione della capacitazione. L'insieme di queste variazioni viene definita “criocapacitazione”. Il metodo migliore per difendere gli spermatozoi dallo shock da freddo è l'aggiunta del tuorlo d'uovo o del latte nell'extender, nonostante non si conosca esattamente il processo con cui ciò avviene. Normalmente gli extender utilizzati per il seme refrigerato prevedono un 20% circa di tuorlo d'uovo e una soluzione tampone al loro interno. Le alternative al tuorlo d'uovo, generalmente più utilizzato, sono il latte scremato, il latte intero e il latte di cocco. Il latte intero, però, è provvisto di lattenina, sostanza spermicida, ed è necessario trattarlo termicamente per eliminarne la tossicità. Per quanto riguarda il latte scremato invece, è stato sostituito con extender aventi il fosfocaseinato.

Visti i danni che si formano a livello di membrana, molti studi hanno valutato l'uso di LDL, glicolipidi o colesterolo negli extender in modo tale da venire incorporati nelle membrane plasmatiche per diminuire la tendenza al cambiamento di stato in fase di refrigerazione.

Negli stalloni la temperatura ottimale di conservazione è compresa tra 4° e 6°C e solitamente gli extender per il seme refrigerato sono a base di latte, possono essere latte scremato, cream-gel (una parte panna rappresa e l'altra gel) oppure latte in polvere scremato fat-free. Altro extender per questa metodica di conservazione è

formato da latte e tuorlo d'uovo oppure è chimicamente definito, come per esempio INRA-96. Quest'ultimo è un extender a base di sali di Hank integrati con 67 mmol/L di lattosio e 27 mmol/L di fosfocaseinato, consente di ottenere dei tassi di gravidanza migliori rispetto agli extender semplici e ancor di più se si rimuove il plasma seminale tramite centrifuga, nonostante ciò, aumento il rischio di danni alla cromatina.

Utilizzando gli extender sopra citati, il rischio determinato dalla velocità di raffreddamento fino a 19°C non incide molto ma tra i 19° e gli 8°C è necessario un raffreddamento lento per evitare lo shock da freddo. La velocità di riduzione della temperatura del seme in situazioni di campo ha visto l'uso di un contenitore di stoccaggio refrigerante, come per esempio l'Equitainer, che consente un controllo adeguato di questa metodica. Il seme diluito viene inserito all'interno di un contenitore coibentato con delle vesciche precedentemente refrigerate che consentono la riduzione ad una velocità adeguata della temperatura. Questi dispositivi permettono di avere un seme relativamente fertile per circa 48 ore. Altro fattore da eliminare, consentendo un aumento della sopravvivenza degli spermatozoi, è l'aria, in quanto in sua presenza si avranno gli effetti negativi di respirazione aerobica e perossidazione lipidica. Tra i possibili antiossidanti utilizzabili vi sono l'acido ascorbico e N-acetilcisteina.

Da un punto di vista scientifico, la dose inseminante con seme refrigerato prevede 250-500 x 10<sup>9</sup> spermatozoi progressivamente motili e solitamente raddoppiato per 1 x 10<sup>9</sup> se l'inseminazione è oltre le 24 ore. Il tasso di concepimento con questa metodica va dal 73 al 75% ma si è notato che in soggetti fertili sono sufficienti dosi inferiori, quali 100 x 10<sup>6</sup>, mantenendo sempre lo stesso tasso mentre con dosi superiori si ha una riduzione della differenza tra i vati stalloni.

## **1.6 ALTERAZIONI DELLA FUNZIONALITÀ SPERMATICA**

Il seme può presentare diverse alterazioni che comportano una ridotta o assente fertilità, in questo capitolo verranno affrontate le alterazioni che incidono principalmente sulla funzionalità spermatica.

### **1.6.1 ANOMALIE DELLO SPERMATOZOO**

Le anomalie che determinano una riduzione della fertilità sono:

- anomala condensazione della cromatina;



- anormale forma del nucleo;
- variazioni nella dimensione complessiva;
- alterazione dell'acrosoma;
- diversa larghezza della base della testa.

Tra tutti quello che si presenta più facilmente è la testa piriforme, si riconosce per la forma stretta ed allungata e la forma appuntita della regione post acrosoma.

La morfologia degli spermatozoi è un parametro importante per valutare la qualità del seme e i disturbi della spermatogenesi danno origine ad anomalie morfologiche dello sperma (Einarsson et al., 2009).

Molte delle alterazioni acrosomiali nascono come anomalie primarie della spermatogenesi, solitamente di tipo ereditario ma anche per insorgenza spontanea, però è possibile che vi siano delle modificazioni anche durante il trasporto lungo l'epididimo, la fase di conservazione e post eiaculazione. L'incremento delle anomalie spermatiche può essere attribuito alla crioconservazione (Najjar et al., 2013). Infatti, è dimostrato che la crioconservazione determina può generare la formazione di alterazioni morfologiche (Bailey et al., 2000) e di membrana del seme di mammiferi.

Tra tutti quello più noto è l'acrosoma nodoso, solitamente è un difetto accidentale comune se presente in bassa percentuale mentre ha origine familiare se presente in percentuale elevata.

Altra anomalia riscontrabile è l'acrosoma distaccato e gonfio che si può sviluppare sia durante la spermatogenesi che come effetto del congelamento e scongelamento del seme. Infine, alterazioni come le creste e le pieghe acrosomiali hanno un'associazione variabile alla riduzione di fertilità.

I vacuoli nucleari sono un'alterazione della spermatogenesi o in risposta ad un insulto al testicolo oppure come anomalia congenita. Possono essere singoli o multipli a livello dell'apice oppure di grandi dimensioni tali da modificare la forma della testa dello spermatozoo. Le alterazioni di tipo ereditario coinvolgono centriolo ed assonema e sono presenti in percentuali elevate. Normalmente nel seme normale sono presenti teste staccate con la forma corretta, ma se presenti in concentrazioni elevate sono date da degenerazione del seme senescente oppure da debolezza congenita dell'attaccamento.

A livello della coda possono esserci diversi tipi di alterazioni, quali:

- “moncone della coda” dove si hanno teste normali ma adese ad una struttura simile ad una gocciolina protoplasmatica;
- code accessorie;
- spermatozoi con anomalie grossolane di coda e del segmento principale, spesso associate ad altre alterazioni nei casi di degenerazione testicolare;
- coda arrotolata;
- segmento principale ispessito;
- difetto del cavatappi;
- segmento terminale arrotolato;
- “Dag defect” che consiste in un apparente scioglimento delle spire della coda dello spermatozoo data da un’alterazione durante la genesi del flagello;
- DMR dove la coda prende la forma di un cappio con una gocciolina distale all’interno dell’anello formatosi;
- coda ad anello che è un difetto post-eiaculazione a seguito di stress termico o ipotonico nei casi di contaminazione del seme con acqua oppure come conseguenza di degenerazione testicolare.

La maggior parte di questi difetti si sviluppano durante la spermatogenesi e determinano l’immobilità degli spermatozoi oppure una motilità subnormale che incide sulla fertilità del soggetto.

Le alterazioni che riguardano il citoplasma derivano da un’incompleta maturazione degli spermatozoi lungo l’epididimo e la presenza di goccioline a livello di testa indica una maggiore immaturità dello spermatozoo rispetto a quelle situate all’estremità distale del segmento principale; quindi, comportano una maggiore gravità del difetto compromettendo significativamente la fertilità.

#### 1.6.2 STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo comporta la produzione di specie reattive all’ossigeno (ROS) durante il metabolismo ossidativo oppure da meccanismi molecolari specifici. Gli spermatozoi non sono provvisti di una gran capacità di eliminazione dei ROS per questo motivo sono presenti all’interno del seme gli spazzini enzimatici, quali catalasi, superossido dismutasi (SOD) e glutazione perossidasi (GPx). Inoltre, vi sono delle sostanze a basso peso molecolare quali albumina, urato, taurina, ipotaurina, piruvato, lattato, acido ascorbico, tocoferolo ed ergotionione che hanno azione antiossidante. L’equilibrio tra i ROS, come i radicali dell’ossidrile,

gli anioni superossido e il perossido di idrogeno, e gli antiossidanti, come la superossido dismutasi e la vitamina E, è normalmente mantenuto attivamente in vivo (Nago et al., 2021). Ciò implica che una qualsiasi alterazione dell'equilibrio tra queste componenti comporta uno stress ossidativo e un conseguente danno cellulare.

Lo stress ossidativo provoca una diminuzione della motilità degli spermatozoi (Iwasaki et al., 1992) e un aumento dei danni al DNA (Desai et al., 2009; Wyrobek et al., 2006).

In situazioni dove si effettua una rimozione del plasma seminale, e di conseguenza di enzimi spazzini e molecole antiossidanti, si ha un aumento della suscettibilità degli spermatozoi ai ROS.

Il principale ROS prodotto dal seme equino è l'anione superossido che dismuta rapidamente per creare il perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e viene prodotto da una NADPH ossidasi (NOX5) specifica della membrana plasmatica presente a livello della testa o nei mitocondri degli spermatozoi. Spermatozoi danneggiati dalla crioconservazione, non vitali o con anomalie morfologiche, tendono a produrre maggiormente ROS. Inoltre, il danno stesso ai mitocondri può causare un disaccoppiamento del metabolismo ossidativo e la formazione di ROS.

Normalmente, nel seme equino si ha una produzione fisiologica di basso livello di ROS da parte di NOX5 in quanto hanno un ruolo nella capacitazione.

Successivamente alla crioconservazione, grazie ad una maggiore concentrazione di calcio intracellulare, gli spermatozoi producono più ROS che non riescono ad essere contrastati a causa della ridotta capacità antiossidante legata alla rimozione del plasma seminale con possibile capacitazione prematura e ridotta longevità degli spermatozoi post scongelamento. Oltre a ciò, si avrà una ridotta motilità che consente di avere un parametro facilmente osservabile in caso di stress ossidativo. Infine, altro effetto che si ha con l'aumentare della produzione dei ROS è il danno al DNA, sia con la conservazione refrigerata che congelata.

La frammentazione del DNA spermatico viene sempre più considerata come un'importante causa di infertilità (Fernández et al., 2003). Una conseguenza di questo danno è la presenza nel liquido seminale sulla base della condizione fisiopatologica del soggetto di spermatozoi apoptotici. Sembra che l'apoptosi sia il risultato finale di diverse patologie e della deregolazione del sistema di controllo della spermatogenesi (Gandini et al., 2000). Inoltre, sono state trovate

correlazioni statisticamente significative tra il livello di frammentazione del DNA, l'anomala morfologia spermatica e la motilità degli spermatozoi (Brahem et al., 2012).

## 1.7 VITAMINA B12

La vitamina B12 o cianocobalamina è una vitamina idrosolubile ed è un coenzima fondamentale nel metabolismo degli acidi nucleici. La molecola generale della cobalamina è un complesso, composto organometallico costituito da 1) un anello corrinico planare con un atomo coordinato di cobalto al centro, e 2) una struttura ribosio-3-fosfato-dimetilbenzimidazolo che si estende al di sotto del piano dell'anello corrinico (Allen et al., 2018). Il cianuro, presente perché artefatto dei sistemi di purificazione, occupa una posizione di coordinazione dell'atomo di cobalto. Il coenzima B12 presenta la stessa struttura della vitamina tranne per il cianuro che è sostituito dal gruppo 5'-deossiadenosina e le reazioni enzimatiche a cui prende parte prevedono lo spostamento nella molecola del substrato da C1 a C2 di un atomo di idrogeno normalmente associato allo spostamento di un altro gruppo nel senso inverso. In virtù del suo fondamentale ruolo di cofattore nella conversione di omocisteina a metionina e la sintesi de novo di timidilato, B12 lavora di concerto con molti altri nutrienti, soprattutto folati, ma anche vitamina B-6 (come piridossale-5-fosfato), riboflavina (come FAD) e colina (Allen et al., 2018).

La cobalamina non può essere sintetizzata dagli organismi superiori e dev'essere assunta con la dieta (Randaccio et al., 2010). La B12 assunta tramite dieta viene rilasciata dalle proteine nello stomaco grazie all'azione degli enzimi gastrici e dal basso pH presente nello stomaco. Le cellule gastriche parietali oltre a produrre l'acido cloridrico necessario a mantenere un pH acido producono il fattore intrinseco (IF). Dopo essere stata rilasciata, la cobalamina si lega ad un R-binder salivare (aptocorrina), il complesso R-B12 assieme a IF arrivano a livello di intestino tenue, dove grazie ad un pH più alto si ha il rilascio di B12 dall'aptocorrina, che verrà digerita dalla tripsina pancreatica, e la formazione del legame tra B12 a IF. Il sito primario di assorbimento intestinale della B12 è l'ileo terminale e avviene tramite endocitosi calcio-dipendente. Dopo essere entrato dentro l'enterocita ileale, il complesso IFB12 entra in un lisosoma dove avviene la degradazione di IF e il rilascio della B12 che può essere metabolizzata nella sua forma attiva di cofattore per essere utilizzata dall'enterocita oppure processata per il rilascio nella circolazione portale

dove si legherà alla transcobalamina insatura. Oltre all'assorbimento di tipo attivo, si ha un assorbimento di tipo passivo in tutta la superficie assorbente del tratto gastrointestinale ma rappresenta una piccolissima percentuale dell'assorbimento complessivo (Allen et al., 2018).

Negli equini, invece, la sintesi di vitamina B12 avviene nel cieco e nel colon grazie all'ingestione del cobalto. In normali circostanze, gli equini adulti ottengono dalla loro dieta una quantità di cobalto sufficiente a soddisfare la loro domanda giornaliera e l'integrazione di cianocobalamina, in forma sintetica, è utile solamente se vi è una carenza di B12 che comporta debolezza ed anemia megaloblastica (Hillyer et al., 2017; Allen et al., 2018). I supplementi sono attualmente consentiti nei cavalli in addestramento. Vi sono studi che hanno dimostrato che concentrazioni superiori a quelle fisiologiche di cobalto migliorano le prestazioni nei ratti e nell'uomo proteggendo i muscoli dallo stress ossidativo e stabilizzano HIF2 $\alpha$ , grazie all'aumento dell'eritropoiesi e quindi della capacità aerobica ed atletica (Lippi et al., 2006; Saxena et al., 2010).

La carenza determinata da un mancato assorbimento ha cause diverse quali un difetto nei meccanismi di assorbimento oppure un'insufficiente produzione di IF-B12 da parte dell'intestino (Allen et al., 2018). In linea con la teoria del triage, si ipotizza che un deficit subclinico di B12 potrebbe indurre danni a lungo termine a macromolecole come acidi nucleici, proteine e lipidi mentre gli individui rimangono apparentemente privi di sintomi (Ames et al., 2006). Poiché i depositi epatici di vitamina B12 superano di gran lunga la perdita giornaliera di vitamina, le carenze possono rimanere clinicamente inesprese per anni (Carmel et al., 2013). Inoltre, a quantità di vitamina B12 necessaria a sopperire il fabbisogno giornaliero è molto inferiore rispetto alla quantità che viene normalmente immagazzinata all'interno dell'organismo, quindi, solitamente i sintomi da carenza impiegano anni per manifestarsi. La concentrazione totale di B12 nel siero o nel plasma è il più comune biomarker utilizzato per determinare lo stato della B12 che include la cobalamina metabolicamente attiva legata alla transcobalamina (holoTC) e la cobalamina legata all'aptocorrina (Allen et al., 2018).

In assenza di cause genetiche, la carenza subclinica di B12 può essere causata da tre fattori generali quali assunzione inadeguata, aumento della domanda e malassorbimento (Thakkar et al., 2015). Una recente analisi metabolomica ha trovato connessioni tra carenza subclinica di B12 e marcatori sierici metabolici di ridotta

stabilità della mielina, funzione dei neuroni periferici, funzione mitocondriale e aumento dello stress ossidativo. Nello specifico, gli autori ipotizzano che la correlazione osservata tra lo stato della vitamina B12 e le acilcarnitine potrebbe essere correlata al miglioramento della funzione mitocondriale, il che potrebbe essere rilevante per il mantenimento dell'omeostasi redox (Brito et al., 2017).

La vitamina B12 è necessaria per la funzione del seme e il conteggio degli spermatozoi; la sua carenza porta all'iperomocisteinemia a causa della ridotta sintesi di metionina dall'omocisteina e il successivo accumulo di omocisteina che è tossica per il seme e influisce negativamente sui parametri spermatici (Tariq et al., 2020).

Nello studio precedentemente citato si è vista una correlazione negativa tra i livelli di B12 e l'infertilità, facendo supporre la necessità di implementare i livelli di B12, acido folico (FA) e acido metilmalonico (MMA) per migliorarla.

Negli esseri umani, è stato riscontrato che la vitamina B12 viene trasferita dal sangue agli organi riproduttivi del maschio, e questo sottolinea un ruolo sostanziale della vitamina B12 nella spermatogenesi, e quindi nella qualità dello seme (Boxmeer et al., 2007). Studi di supporto hanno dimostrato che le concentrazioni plasmatiche di vitamina B12 sono inferiori negli uomini sterili rispetto ai fertili (S.Dhillon et al., 2007). Inoltre, lo studio di Boxmeer e colleghi ha dimostrato una correlazione tra la conta spermatica e la concentrazione di vitamina B12 nel plasma seminale. Solo alcuni studi hanno presentato l'effetto smussato della vitamina B12 sulla qualità del seme (Banihani et al., 2017).

In ambito umano vi sono molti studi che hanno utilizzato una combinazione di diversi antiossidanti, tra cui la B12, per migliorare la conta totale degli spermatozoi motili. Da molto tempo ormai, lo stress ossidativo seminale, che deriva da uno squilibrio tra la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e lo scavenging degli antiossidanti seminali, è stato ritenuto uno dei principali fattori nella patogenesi della disfunzione spermatica nell'infertilità maschile (Terai et al., 2019).

In questo senso, una prima linea di difesa contro lo stress ossidativo che colpisce la fertilità maschile è determinare se la supplementazione di antiossidanti per via orale può migliorare i parametri del seme e gli esiti correlati alla gravidanza (Abad et al., 2013). Durante il loro studio, Abad e i suoi colleghi hanno osservato:

- ridotte proporzioni di spermatozoi con DNA frammentato successivamente al trattamento con antiossidanti;
- grande longevità del DNA integro grazie al trattamento antiossidante;

- miglioramento del DNA spermatico tramite neutralizzazione esogena degli ossidanti e miglioramento del processo di rimodellamento nucleare degli spermatozoi;
- non tutti i pazienti hanno risposto allo stesso modo e in alcuni gli effetti sono stati più pronunciati rispetto ad altri;
- pazienti infertili con astenoteratozoospermia (ATZ) grazie agli antiossidanti somministrati hanno presentato un miglioramento della vitalità degli spermatozoi e della motilità progressiva.

Miglioramenti simili si sono visti nello studio condotto da Najafipour e colleghi, dove però i soggetti presi in considerazione avevano diversi tipi di genotipi MTHFR e assumevano con la dieta diversi dosaggi di vitamina B9 e B12. Gli individui che assumevano una quantità di B9 e B12 superiore al cut-off da loro stabilito, nonostante le concentrazioni sieriche fossero nella norma, e presentavano l'allele T, che ha un forte impatto sull'infertilità maschile, non hanno subito alterazioni dei parametri del seme.

Lo studio di Hosseinabadi del 2020 è il primo che tratta la somministrazione della vitamina B12 tramite il mezzo di congelamento del seme umano e riporta un miglioramento della motilità e della vitalità a determinati dosaggi (1 mg/mL e 2 mg/mL). Inoltre, l'aggiunta di B12 alla dose di 2 mg/mL ha mostrato significative differenze nella frammentazione del DNA rispetto al gruppo di controllo. Questo risultato simile ad altri studi ha confermato che la vitamina B12 può ridurre la frammentazione del DNA avvenuta durante la crioconservazione. La capacità antiossidante della vitamina B12 probabilmente protegge il DNA dalle rotture causate dalla crioconservazione (Hosseinabadi et al., 2020). In generale le proprietà antiossidanti della B12 includono:

- scavenging diretto dei ROS, specialmente superossido;
- tramite la conservazione del glutathione, possibile stimolo dello scavenging indiretto dei ROS;
- protezione dalla risposta immunitaria indotta dallo stress ossidativo attraverso la modulazione delle citochine e della produzione del fattore di crescita;
- diminuzione dello stress ossidativo indotto dall'omocisteina (Terai et al., 2020; Lagemaat et al., 2019).

Per quanto riguarda le altre specie vi sono diversi studi che trattano l'utilizzo della B12 per migliorare la qualità del seme. Beltrame e i colleghi, nel loro studio, hanno

somministrato la cobalamina per prevenire i danni e il fallimento androgenico indotto dalla cimetidina e hanno notato che i ratti trattati con la B12 avevano i livelli di testosterone e l'attività steroidogenica invariati. Inoltre, vi era un miglioramento nella qualità del seme. I loro risultati hanno dimostrato che la vitamina B12 è in grado di mantenere l'attività steroidogenica così come un normale livello di testosterone sierico nei ratti trattati con un distruttore di androgeni (Beltrame et al., 2019).

Uno studio condotto sugli arieti ha dimostrato che l'aggiunta di B12 con un dosaggio di 2 mg/mL nell'extender Tris aggiunto al seme successivamente congelato e scongelato, aumenta la motilità totale, la motilità progressiva, la vitalità e il numero di spermatozoi normali. Grazie a questo studio si è potuto dedurre che la B12 è in grado di proteggere il seme durante la conservazione a 5°C e il congelamento. La B12 ha probabilmente fornito una protezione agli spermatozoi dai difetti morfologici prevenendo i danni ossidativi da parte dei radicali liberi, in questo modo ha permesso di preservare l'attività metabolica e la vitalità cellulare degli spermatozoi degli arieti (Hamedani et al., 2013).

Per quanto concerne i tori vi sono diversi studi che trattano l'utilizzo della vitamina B12 per migliorare la qualità del seme ma pochi hanno utilizzato metodiche non convenzionali per l'analisi. I convenzionali parametri di qualità del seme non forniscono informazioni sull'integrità del DNA, che è fondamentale per la fase di fecondazione, lo sviluppo dell'embrione, la gravidanza e i risultati riproduttivi (Mizera et al., 2019).

In uno studio condotto sui tori si è visto che l'aggiunta di 2,50 mg/mL di vitamina B12 nel mezzo di congelamento aumenta la motilità degli spermatozoi, le caratteristiche del movimento e l'integrità dell'acrosoma e della membrana. L'aggiunta di vitamina B12 ha aumentato lo stato antiossidante come indicato dall'aumento dell'attività glutatione-perossidasi, che danno protezione contro la perossidazione lipidica spontanea (Hu et al., 2009).

Anche nello studio condotto da Mizera e i suoi colleghi si è visto che un supplemento di 2,50 mg/mL di B12 nell'extender, utilizzato nel seme successivamente congelato, comporta un miglioramento della motilità e della vitalità degli spermatozoi da seme scongelato. Inoltre, hanno trovato una significativa percentuale bassa di danni al DNA tra i soggetti trattati con B12 e il gruppo di controllo.

Sulla base dei risultati degli studi di Hu e di Mizera, si può concludere che la vitamina B12 possiede delle notevoli proprietà che consentono di ridurre i danni al DNA e



migliorare la motilità e la vitalità degli spermatozoi dopo lo scongelamento se somministrata nell'extender con un dosaggio di 2,50 mg/mL.

Uno studio particolarmente interessante è quello condotto da Ahmed e colleghi dove l'integrazione di vitamina B12 nel mezzo di crioconservazione ha apportato miglioramenti ai valori relativi la motilità degli spermatozoi, la cinematica del movimento, le variabili strutturali/funzionali, gli enzimi antiossidanti e le concentrazioni di ATP degli spermatozoi di bufalo. Inoltre, si è vista una notevole riduzione della lipoperossidazione (LPO), della produzione di ROS e di cambiamenti simili all'apoptosi rispetto ai campioni di controllo. Diversamente dagli studi su bovini e ovini, nel bufalo l'integrazione di B12 nel mezzo di crioconservazione che ha apportato i maggiori benefici ai parametri del seme e un maggiore tasso di scissione negli ovociti inseminati con il seme trattato presentava un dosaggio di 5 mg/mL. Il miglioramento del tasso di scissione può essere determinato dal fatto che la cobalamina ha capacità antiossidanti che portano a condizioni favorevoli per ridurre lo stress ossidativo e LPO negli spermatozoi di bufalo durante il congelamento-scongelamento (Ahmed et al., 2021).

Diversamente dalle altre specie negli stalloni non sono stati condotti degli studi riguardanti la somministrazione di B12 nell'extender. È stato, però, condotto uno studio da Cazales e colleghi in cui hanno somministrato intramuscolo la vitamina B12 assieme al butafosfano per valutare la qualità del seme fresco e congelato. Purtroppo, però, l'esperimento non ha portato alcun tipo di differenze tra i soggetti trattati e non per quanto riguarda la motilità, l'integrità di membrana e la funzionalità di membrana. Altro studio eseguito sugli equini, successivamente a quello condotto da Cazales, è quello effettuato da Penino e colleghi in cui hanno dimostrato che l'uso prolungato di butafosfano e cobalamina non altera la qualità seminale di stalloni giovani e fertili. Sia la cobalamina che il fosforo organico riducono gli effetti negativi dei glucocorticoidi in risposta a fattori stressanti e migliorano la proliferazione cellulare e il sistema circolatorio. Pertanto, una fonte di fosforo organico e cobalamina come integratore dovrebbe migliorare la spermatogenesi e la qualità del seme in stalloni ipofertili o senili. Nonostante questi presupposti, lo studio non ha mostrato alcun tipo di miglioramento o peggioramento dei parametri qualitativi del seme nei soggetti trattati. È possibile che l'esito inconcludente di questi studi non sia dovuto alle sostanze somministrate quanto alla metodica utilizzata perché, come è stato visto nello studio di Suwimonteerabutr et al., l'aggiunta dello 0.3% di B12 e butafosfano nell'extender,

utilizzato per il seme di verro, ha aumentato la motilità spermatica, i parametri cinetici del seme e la morfologica spermatica. Sulla base di ciò che hanno osservato, hanno potuto constatare un miglioramento della qualità del seme ma se addizionati in eccesso comportano un aumento dello stress ossidativo sbilanciando il meccanismo di produzione e neutralizzazione dei ROS. Sulla base di tutti gli studi presi in considerazione si può constatare che la B12 consente di migliorare i parametri qualitativi nella maggior parte delle specie ma la via di somministrazione utilizzata nei soggetti trattati ne determina l'efficacia.

## **2. OBIETTIVI**

L'obiettivo dello studio è valutare se vi sia un miglioramento qualitativo dei parametri di motilità e funzionalità del seme refrigerato di stallone grazie all'aggiunta di vitamina B12 (CNCbl) all'extender. Le valutazioni della motilità totale, motilità progressiva, morfologia, integrità dell'acrosoma e funzionalità di membrana sono effettuate sia prima che dopo le metodiche di refrigerazione a 24 ore per verificare se la CNCbl possa aumentare i tempi di sopravvivenza del seme refrigerato e trasportato a fini commerciali.

### **3. MATERIALI E METODI**

Per la sperimentazione è stato utilizzato il seme di sei stalloni di proprietà di razza KWPN e Holstain di età compresa tra i 12 e 23 anni, presenti nel centro di produzione materiale seminale di AI top stalloni a Ferrara (FE). Nel centro sono stati, inoltre, effettuati i prelievi e la lavorazione del seme mentre le valutazioni sono state eseguite presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico a Legnaro (PD).

#### **3.1 DISEGNO SPERIMENTALE**

Per ogni stallone sono stati effettuati 3 prelievi a 48 ore di distanza ciascuno tramite una vagina artificiale di tipo Colorado. Subito dopo la raccolta è stata rimossa la frazione di gel mediante un filtro di cellulosa (Microtube). Tramite l'emocitometro Burker è stata effettuata la conta per stabilire la concentrazione spermatica e ogni eiaculato è stato suddiviso in cinque aliquote uguali.

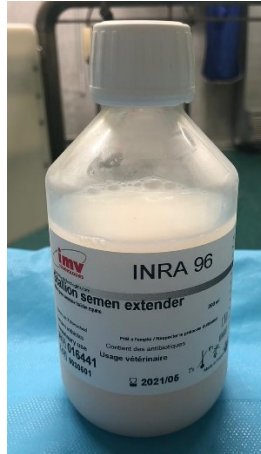
Ogni frazione è stata poi centrifugata a 1500 giri per 12min ed è stato rimosso il surnatante. I pellet spermatici ottenuti sono stati risospesi alla concentrazione di  $100 \times 10^6$  spermatozoi/mL nei seguenti gruppi:

- CTRL: INRA96 per il gruppo di controllo (0 mg/mL di CNCbl);
- A: INRA 96 con l'aggiunta di 1.25 mg/mL di CNCbl;
- B: INRA 96 con l'aggiunta di 2.50 mg/mL di CNCbl;
- C: INRA 96 con l'aggiunta di 3.45 mg/mL di CNCbl;
- D: INRA 96 con l'aggiunta di 5.00 mg/mL di CNCbl.

Tutti i campioni avevano un volume finale di 1 mL e le concentrazioni di CNCbl sono state stabilite sulla base degli studi condotti su bovini (Hu et al., 2007; Mizera et al., 2019).

#### **3.2 MATERIALI**

- INRA96: extender per la conservazione del seme equino fresco e refrigerato tra i 15°C e i 4°C contenente frazioni purificate di proteine micellari del latte, penicillina, gentamicina ed amfotericina B (Fig. 6);



**Fig. 6** INRA96

- Cianocobalamina (CNCbl, Sigma Aldrich);
- Provette di plastica con il tappo rosso;
- Vetrini per il microscopio ottico;
- Vetrino copri oggetti;
- Vetrini Cell-Vu<sup>®</sup>: per la valutazione della motilità spermatica (MOT%) e motilità progressiva (PMS%);
- Emocitometro di Burker;
- Hamilton Thorne Biosciences (IVOS, animal Version 12.3D Bild 002): analisi computerizzata del seme (CASA) (Fig. 7);



**Fig. 7** Hamilton Thorne Research

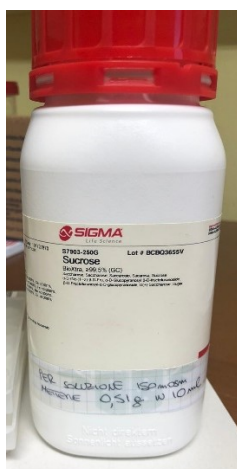
- Provette per microcentrifuga;
- Contenitori eppendorf;

- Micropipettatrice;
- Colorazione eosina-nigrosina;
- Spermac Stain™ (Minitube): kit di colorazione per l'analisi morfologica degli spermatozoi contenente un colorante rosso (A), un colorante verde chiaro (B), un colorante verde scuro (C) e un fissativo (FIX) (Fig. 8);



**Fig. 8 SpermacStain**

- Millipore Sigma: soluzione iposmotica di saccarosio (Fig. 9);



**Fig. 9 Millipore Sigma**

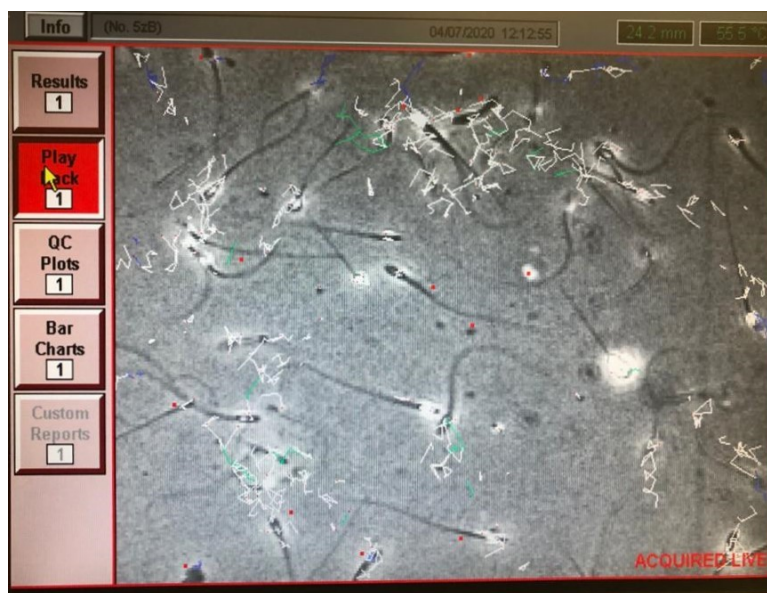
- Acqua distillata;
- Fogli di alluminio;
- Microscopio ottico;
- Elitech RC-5 (London, UK): registratore di temperature.

### 3.3 METODI

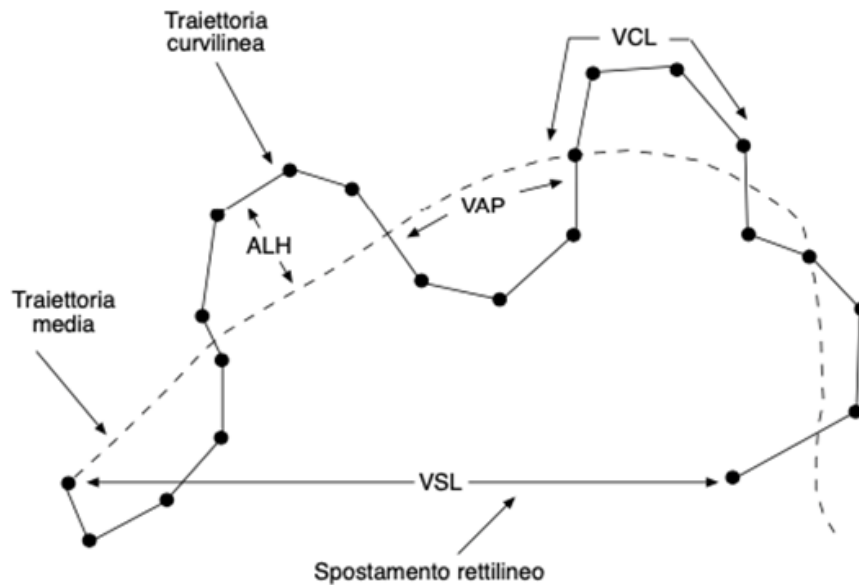
Di ogni campione sono state valutate motilità, vitalità, morfologia, integrità dell'acrosoma e della membrana. La valutazione è stata effettuata entro 15 minuti dalla diluizione (T0) e dopo conservazione a 4°C per 24 ore (T24).

Per il periodo di refrigerazione, i campioni sono stati avvolti in un foglio di alluminio in modo tale da evitare l'esposizione in frigorifero alla luce. Il mantenimento della corretta refrigerazione è stato monitorato grazie ad un registratore di temperatura. Per le analisi a T24, i campioni sono stati riscaldati a 37°C per 5 minuti a bagnomaria per poi essere analizzati.

I parametri relativi alla motilità sono stati valutati con CASA (Computer – Assisted Sperm Analysis; Fig. 10) su vetrino Cell-Vu<sup>®</sup> provvisto di due camere di conta preriscaldato a 37°C con 15µL di seme e sono stati analizzati >800 spermatozoi ad ingrandimento 40x. Sono stati valutati la motilità totale degli spermatozoi (MOT%), la motilità progressiva (PMS%), la velocità media del percorso (VAP), la velocità in linea retta (VSL), la velocità in linea curva (VCL), l'ampiezza dello spostamento laterale della testa (ALH), la rettilineità (STR) e l'indice di linearità (LIN; Fig. 11).

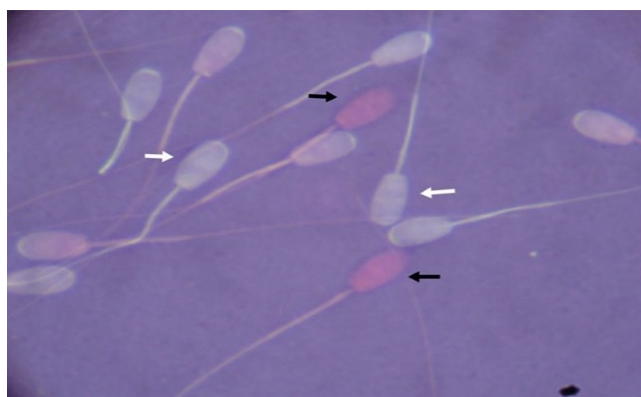


**Fig. 10** Esame del seme con CASA.



**Fig. 11** Rappresentazione grafica delle variabili fornite dal CASA.

Per valutare la vitalità del seme è stata utilizzata la colorazione eosina-nigrosina (Fig. 12), su un campione di seme di  $8\mu\text{L}$  sono stati aggiunti e mescolati  $8\mu\text{L}$  di eosina e  $8\mu\text{L}$  di nigrosina. La soluzione ottenuta è stata stesa su un vetrino lasciato ad asciugare su piastra riscaldante a  $37^\circ\text{C}$  e analizzato al microscopio ottico ( $100\times$ ). Gli spermatozoi sono stati classificati come vivi se la testa era colorata di bianco e morti se colorata di rosa. I risultati ottenuti sono stati riportati come percentuale di spermatozoi vivi per spermatozoo totale (LIVE%).

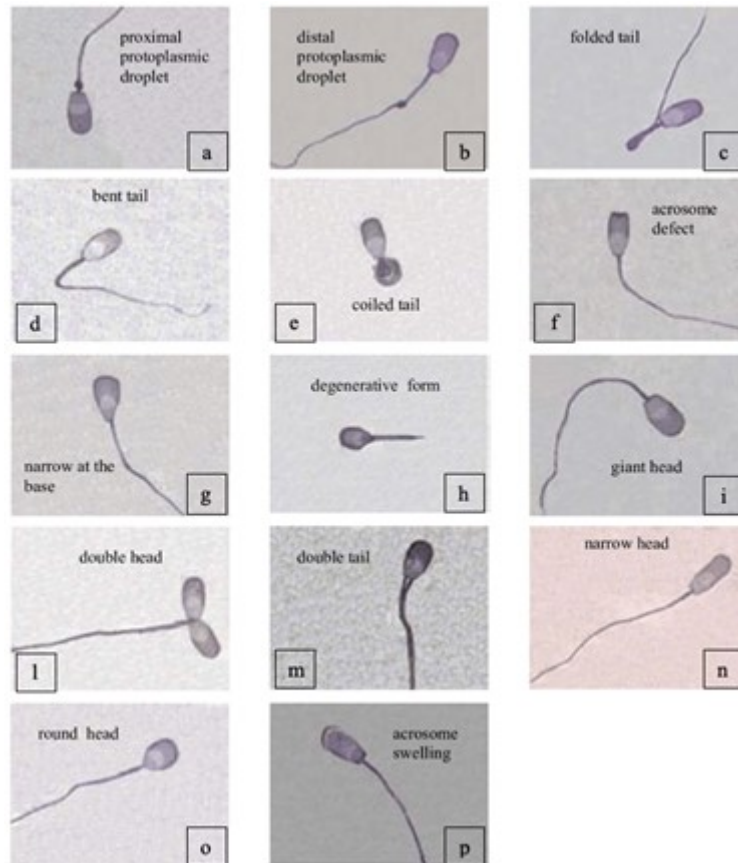


**Fig. 12** Colorazione eosina-nigrosina e osservazione al microscopio. Gli spermatozoi bianchi (freccie bianche) sono vivi mentre gli spermatozoi rosa (freccie nere) sono morti.

La valutazione della morfologia del seme (Fig. 13) e l'integrità dell'acrosoma è stata effettuata con Spermac Stain™ (Fig. 14), il vetrino viene preparato con uno striscio di



seme lasciato ad asciugare a temperatura ambiente (RT) e posto nel fissativo per 5 minuti. Dopo un lavaggio in acqua distillata per immersione, viene colorato con i diversi coloranti, prima A per 3 minuti, poi B per 1 minuto ed infine C per 30 secondi. Tra ogni colorazione il vetrino viene immerso in acqua distillata. Al termine della colorazione con i tre coloranti, il vetrino viene lasciato ad asciugare a RT e osservato al microscopio ottico con ingrandimento 100x.



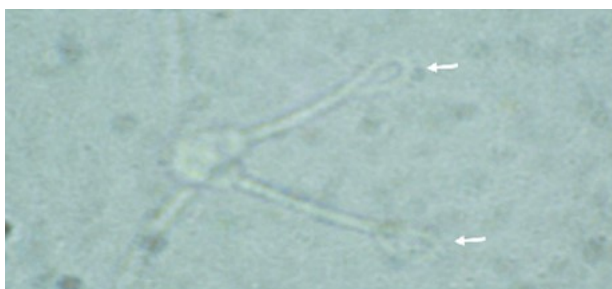
**Fig. 13** Anomalie morfologiche più comuni dello spermatozoo. Le più comuni riportate nell'immagine sopra sono, in ordine: **a)** goccia citoplasmatica prossimale, **b)** goccia citoplasmatica distale, **c)** coda piegata, **d)** coda ricurva, **e)** coda arrotolata, **f)** difetto acrosomiale, **g)** restringimento alla base della testa, **h)** spermatozoo degenerato, **i)** macrocefalia, **l)** testa doppia, **m)** coda doppia, **n)** testa schiacciata, **o)** testa arrotolata, **p)** rigonfiamento acrosomiale.



**Fig. 14** Colorazione Spermac Stain <sup>TM</sup> e osservazione al microscopio.

Per quanto riguarda i parametri morfologici, gli spermatozoi sono stati classificati come normali (nessun difetto morfologico) o non normali, mentre per l'integrità dell'acrosoma il seme è stato classificato come percentuale di acrosoma intatto per spermatozoo (%ACR). L'acrosoma è stato considerato integro quando la regione acrosomiale anteriore si colorava di verde o verde scuro mentre la regione post acrosomiale posteriore era di colore rosso-rosa.

Infine, per l'analisi della funzionalità di membrana è stato effettuato il test HOS (rigonfiamento iposmotico; Fig. 15) che prevedeva di diluire 10 $\mu$ L di seme in 100 $\mu$ L di Millipore Sigma (150mOsm di saccarosio) in una eppendorf per poi incubarli a 37°C per 30 minuti. Gli spermatozoi sono stati successivamente valutati come HOS+ (rigonfiamento della coda) e HOS- (nessun rigonfiamento della coda), i risultati ottenuti sono stati riportati come %HOS+ di spermatozoi. Sono stati esaminati casualmente al microscopio ottico da un singolo operatore 400 spermatozoi per ogni vetrino e suddivisi in base alle loro caratteristiche.



**Fig. 15** Esame del seme con HOS test. Gli spermatozoi indicati dalle frecce bianche presentano un arricciamento della coda, indice di membrana plasmatica intatta.

## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 ANALISI STATISTICA

Le varie analisi statistiche sono state effettuate tramite R Core Team (2018) versione 3.5.1 (R: un linguaggio ed un ambiente per il calcolo statistico; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). I parametri del seme sono stati esaminati utilizzando un modello misto a due fattori basato su misurazioni ripetute e comparazioni a coppie regolate sul metodo Tukey.

Gli effetti del trattamento, l'incubazione (0h e 24h) e l'interazione sono stati considerati come effetti fissi mentre i diversi stalloni un effetto casuale. È stato stabilito che le differenze statistiche si verificano a  $P < 0.05$ .

### 4.2 RISULTATI

Confrontando il CTRL e i campioni trattati non sono state evidenziate delle differenze statisticamente rilevanti ( $P > 0.1$ ) per i diversi parametri, quali %MOT, %PMS, VAP, VCL, VSL, ALH, STR, LIN e % di spermatozoi normali (Tabella 1). Il valore più basso registrato per %MOT è stato quello di CTRL a T24 rispetto a tutti gli altri campioni trattati e analizzati dopo 24 ore. Tutti i campioni trattati hanno mostrato una motilità totale simile a CTRL a T0 ma non presentavano differenze significative tra stalloni diversi o dosaggi differenti di B12 (Tabella 1). Inoltre, è stata osservata una motilità totale maggiore del 10% o superiore per ogni campione trattato rispetto a CTRL a T24 in ogni stallone sottoposto all'indagine (Tabella 2 e Fig. 16). Nel modello Dunnett basato sulla procedura di confronto multiplo, CTRL a T24 presentava una motilità totale inferiore ( $P = 0.057$ ) rispetto a CTRL T0.

Non si sono viste differenze tra i trattamenti per quanto riguarda %PMS e solamente i campioni B e D avevano valori lievemente superiori a CTRL a T24 (Fig. 17).

Nemmeno la velocità media di traiettoria, velocità curvilinea media e velocità media rettilinea hanno mostrato differenze significative, mentre alcuni valori di D sono superiori a tutti gli altri campioni (Fig. 18, 19 e 20).

Per quanto riguarda la linearità media solamente il campione B presentava dei valori superiori a tutti gli altri campioni che non avevano differenze significative rispetto a CTRL T0 (Fig. 21).

I parametri di STR non differivano tra loro, ma B aveva valori nettamente superiori ai trattamenti e CTRL (Fig. 22). Infine, per quanto riguarda ALH solamente C e D presentavano dei valori superiori agli altri campioni trattati e ai CTRL (Fig. 23). I campioni trattati A, B e C avevano valori %LIVE simili rispetto a CTRL a T0 e significativamente superiori ai campioni trattati D e CTRL a T24. Tra tutti i campioni trattati B ha registrato i più alti valori di %LIVE ( $65.7 \pm 1.71\%$ ) (Tabella 1 e Fig. 24). Si sono, inoltre, notate delle differenze statistiche per %HOS e %ACR tra CTRL a T0 e CTRL e campioni trattati a T24. In particolare, per %HOS, i campioni B, C, D e CTRL a T24 hanno mostrato dei valori maggiori ( $P < 0.001$ ) rispetto a CTRL a T0 (Tabella 1), senza però differire dal campione A (Fig. 25). Per il parametro %ACR tutti i campioni trattati hanno mostrato valori simili a CTRL a T0 tranne B che presentava un %ACR+ ( $P < 0.02$ ) minore rispetto a CTRL a T0 (Tabella 1). Nonostante ciò, non si sono notate differenze significative tra i campioni trattati e CTRL a T24 (Fig. 26). Infine, per quanto riguarda la morfologia B ha mostrato i valori più bassi rispetto ai trattamenti e ai CTRL, mentre CTRL T24, A, C e D avevano dei valori superiori a CTRL T0 (Fig.27).

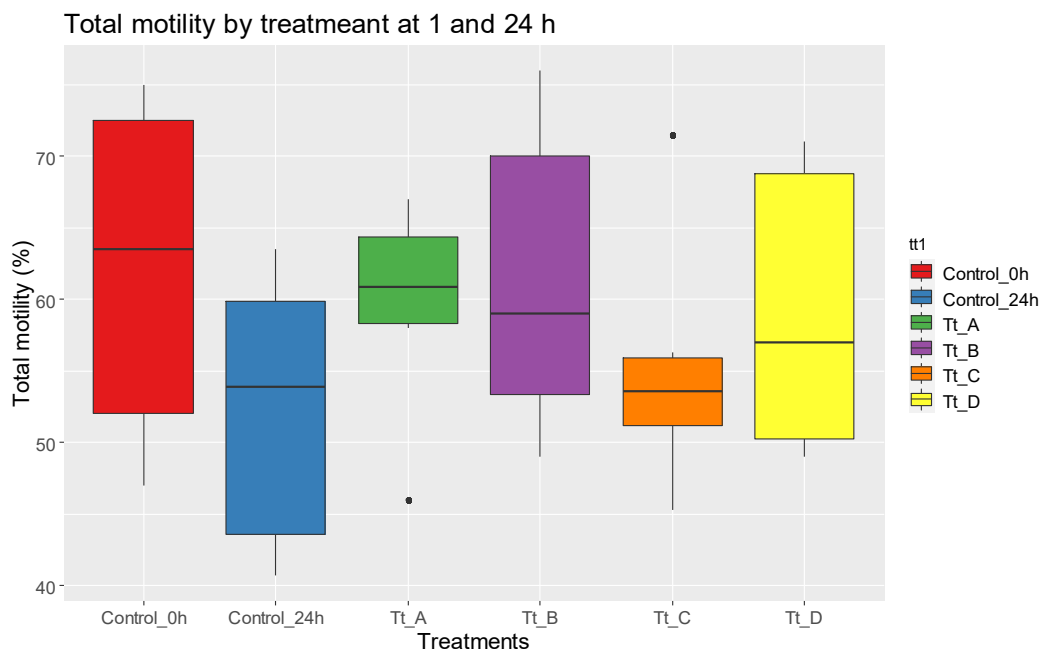
	T0		T24			
	CTRL	CTRL	A	B	C	D
%MOT	58.8	49.9	57.2	57.2	55.6	57.4
%PMS	45.6	41.5	45.0	47.6	46.0	47.4
VAP	101.5	97.0	94.1	100.7	101.1	98.3
VCL	146	138	134	143	145	141
VSL	89.7	85.8	83.5	89.7	90.0	86.9
ALH	10.1	10.4	10.2	10.0	10.6	10.3
STR	89.1	88.9	88.7	89.3	89.1	88.7
LIN	63.6	64.2	64.2	64.3	64.2	63.6
%HOS+	94.3 a	96.7 b	96.2 ab	96.9 b	96.6 b	96.9 b
%ACR+	89.9 b	85.7 ab	86.6 ab	83.3 a	85.1 ab	86.2 ab
%LIVE	65.0 c	56.6 ab	61.0 bc	65.7 c	61.6 bc	51.5 a
%NORMAL	76.3	78.4	77.7	70.7	79.2	76.7

%MOT: % di spermatozoi motili; %PMS: % di spermatozoi progressivamente motili; VAP: velocità media di traiettoria ( $\mu\text{m/s}$ ); VCL: velocità curvilinea media ( $\mu\text{m/s}$ ); VSL: velocità media rettilinea ( $\mu\text{m/s}$ ); ALH: movimenti laterali medi della testa ( $\mu\text{m}$ ); STR: rettilineità media (STR=VSL/VAP); LIN: linearità media (LIN=VSL/VCL); %HOS+: % di spermatozoi aventi un rigonfiamento della coda; %LIVE: % di spermatozoi vivi; %NORMAL: % di spermatozoi non aventi difetti morfologici.

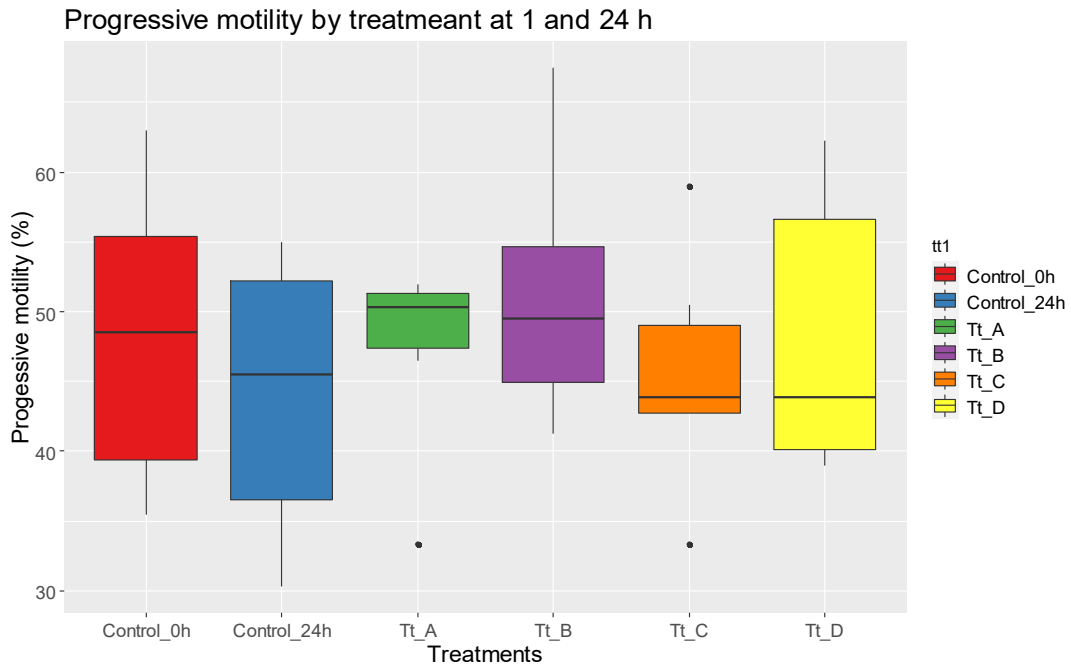
**Tabella 1.** Risultati dei diversi parametri del seme di tutti i trattamenti in ogni momento (T0 e T24), le lettere minuscole indicano una differenza statisticamente rilevante

Stallion	CTRL at T24	Treatment at T24			
		A	B	C	D
1	60.3	60.7	65.7	67.3	63.7
2	49.3	48.3	54.0	50.7	49.0
3	54.3	65.0	72.7	56.3	71.0
4	47.3	52.7	52.5	52.2	52.0
5	40.7	63.7	46.0	54.7	57.0
6	40.6	63.6	56.3	54.6	57.0

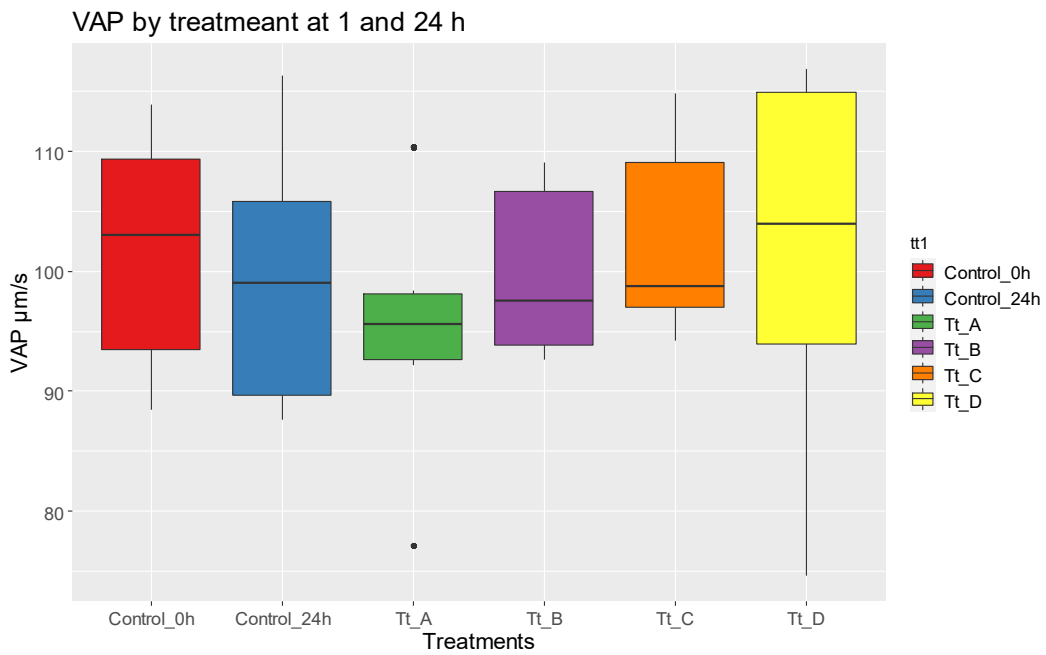
**Tabella 2.** Valori di %MOT a T24 per ogni stallone e per tutti i campioni trattati



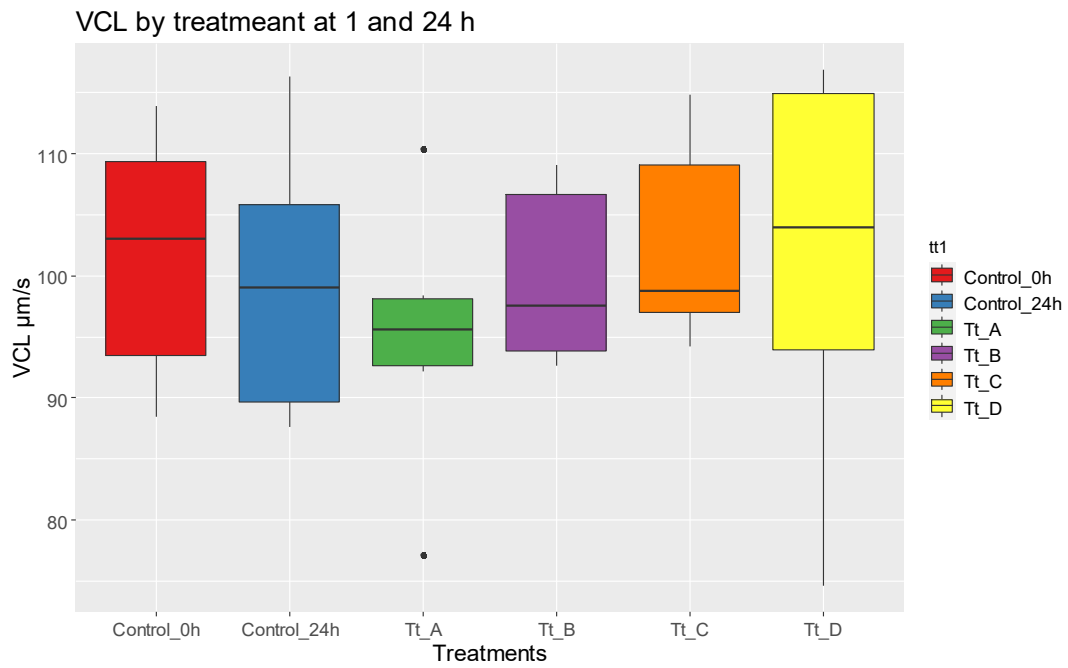
**Fig. 16** Box plot di %MOT per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



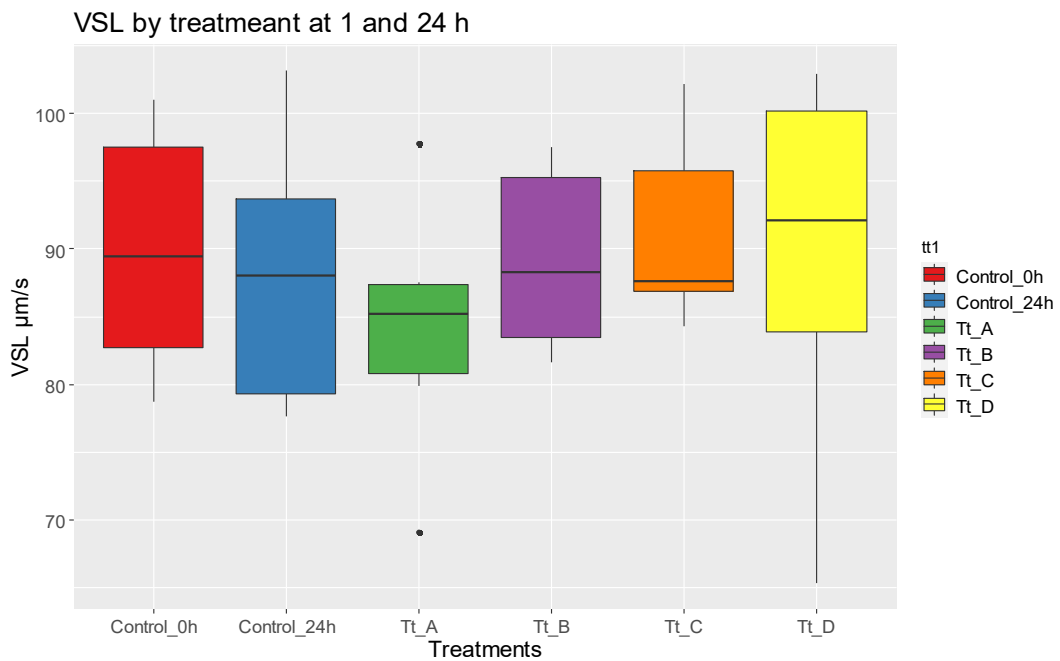
**Fig. 17** Box plot di %PMS per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



**Fig. 18** Box plot di VAP per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.

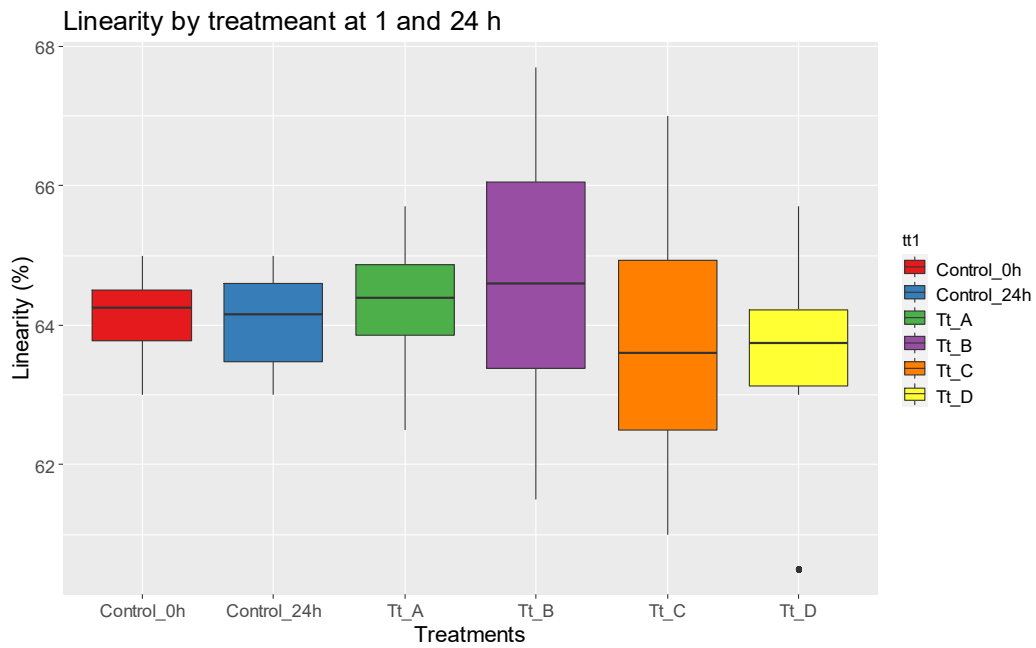


**Fig. 19** Box plot di VCL per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.

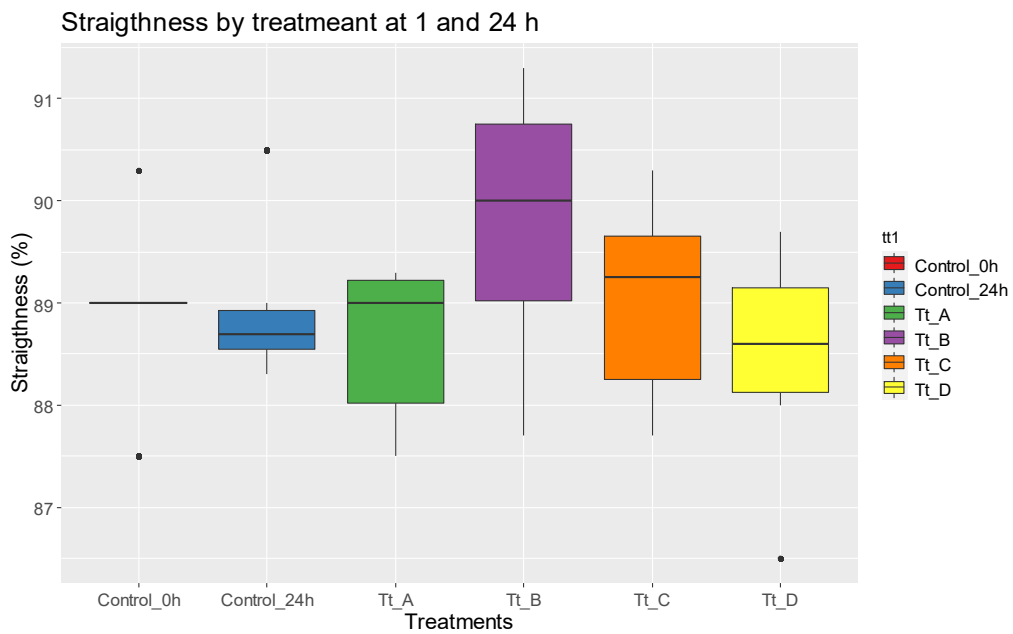


**Fig. 20** Box plot di VSL per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.

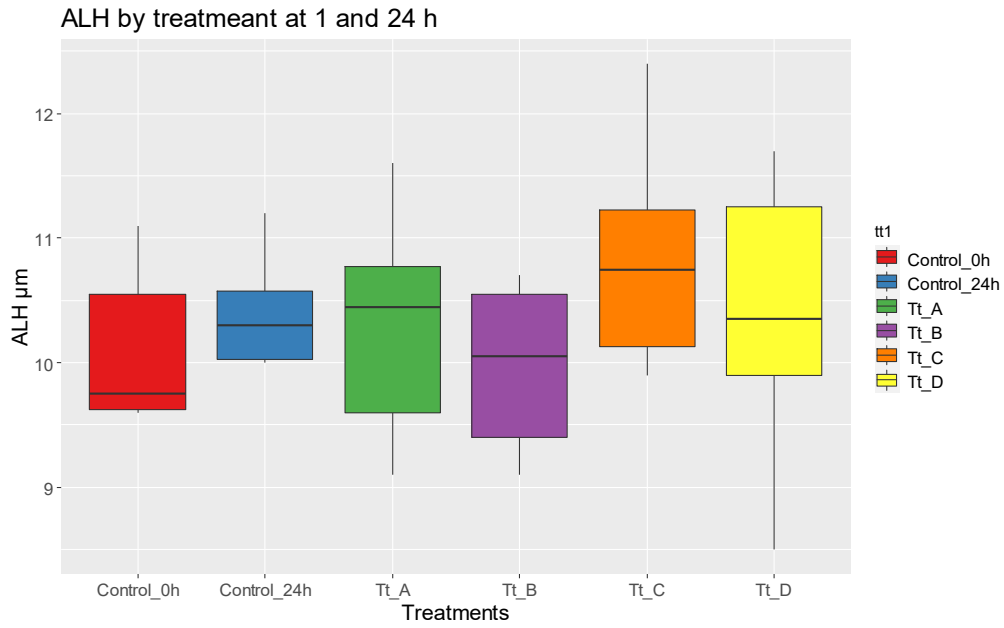




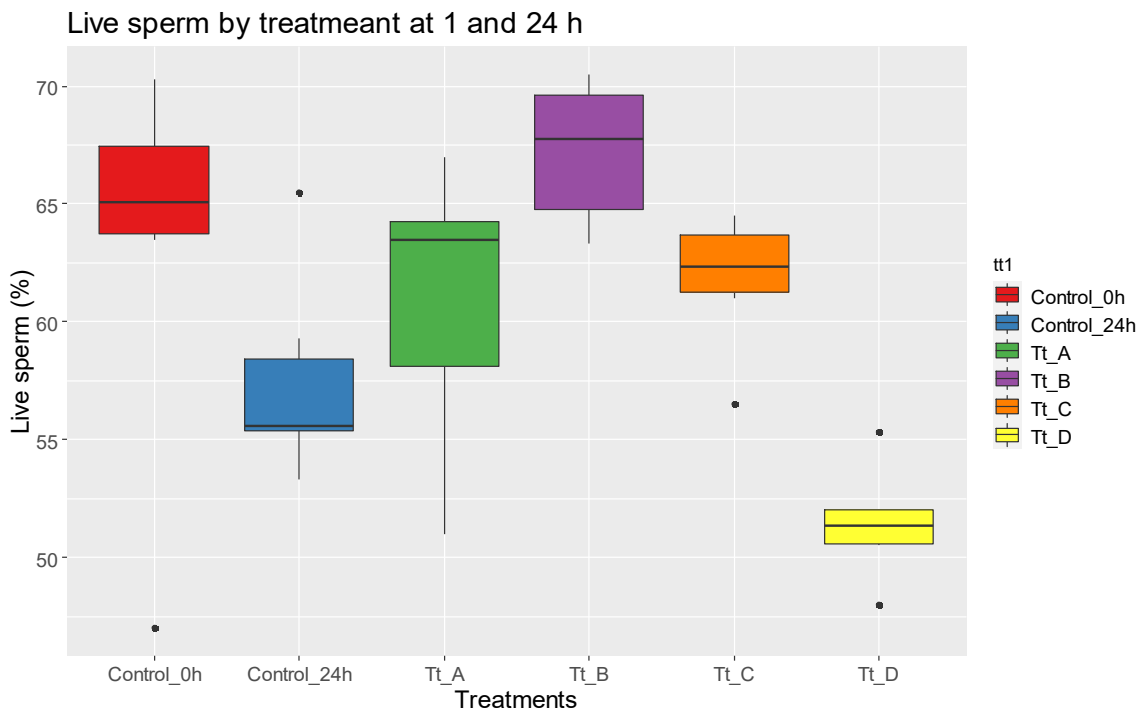
**Fig. 21** Box plot di LIN per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



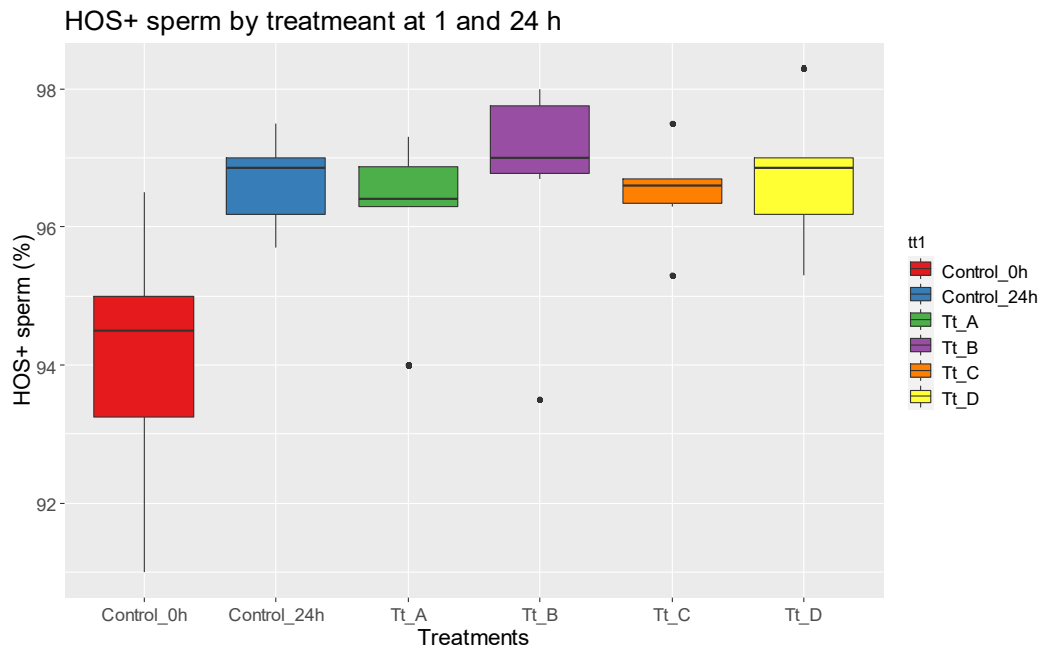
**Fig. 22** Box plot di STR per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



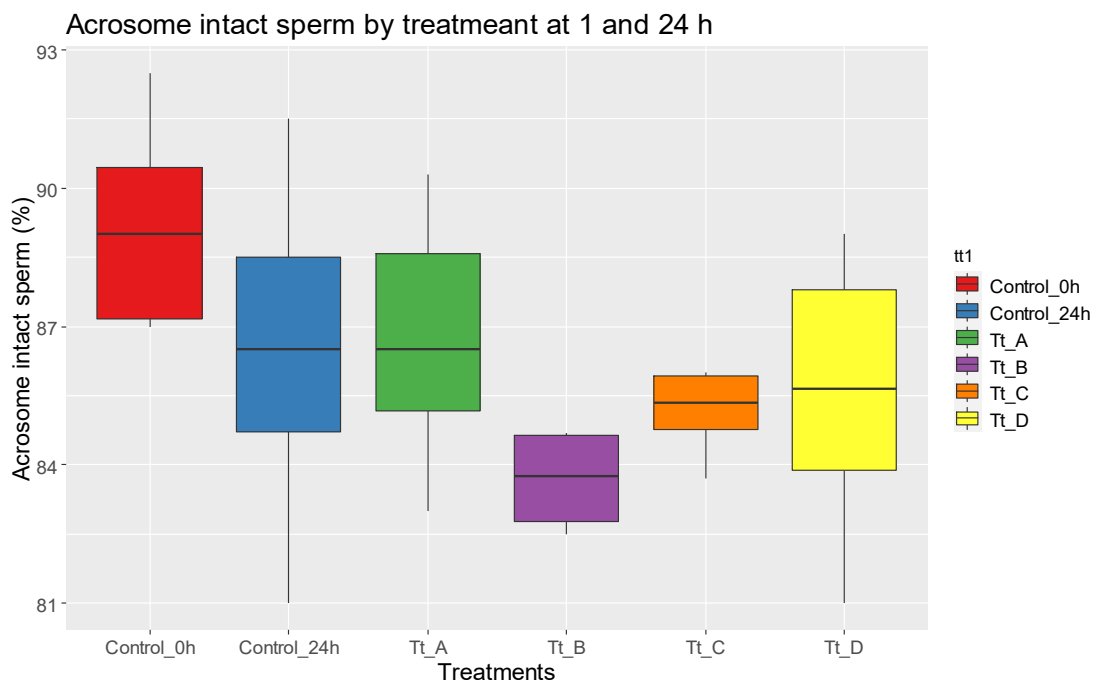
**Fig. 23** Box plot di ALH per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



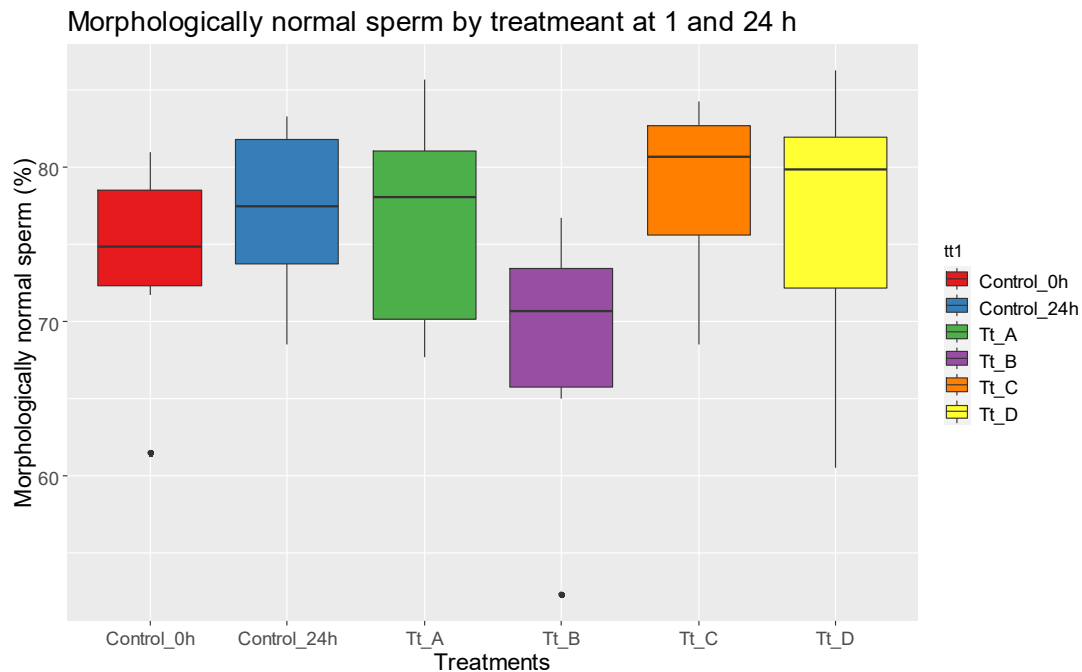
**Fig. 24** Box plot di %LIVE per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



**Fig. 25** Box plot di %HOS per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



**Fig. 26** Box plot di %ACR per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.



**Fig. 27** Box plot di %NORMAL per tutti i campioni in ogni momento. I valori anomali sono indicati come punti.

### 4.3 DISCUSSIONE

Negli esseri umani, è stato riscontrato che la vitamina B12 viene trasferita dal sangue agli organi riproduttivi maschili sottolineando il suo ruolo significativo nella spermatogenesi, e quindi nella qualità del seme. Inoltre, i ricercatori hanno dimostrato una correlazione tra la conta spermatica e la concentrazione di vitamina B12 nel plasma seminale (Boxmeer et al., 2007).

Nei diversi studi sui bovini si è visto che la motilità spermatica aumenta significativamente quando si aggiungono 2.50 mg/mL di B12 al mezzo di congelamento. Inoltre, hanno osservato un aumento di VSL, VCL, STR, VAP e della protezione del DNA dalla frammentazione (Hu et al., 2009; Mizera et al., 2019). Lo studio condotto da Cazales e colleghi, dove hanno somministrato intramuscolo butafosfano e B12, non ha mostrato differenze significative su motilità, integrità e funzionalità di membrana, quindi, non hanno alterato la qualità del seme degli stalloni. Anche nello studio di Penino e dei colleghi l'uso prolungato di butafosfano e cobalamina per via sistemica non ha alterato la qualità del seme di giovani stalloni fertili. Questi elementi sono importanti nei processi di rilascio di energia e nella stabilità strutturale degli acidi nucleici e della membrana cellulare. Sia la cobalamina che il fosforo organico riducono gli effetti negativi dei glucocorticoidi in risposta a fattori di

stress e migliorano la proliferazione cellulare e il sistema circolatorio. Perciò, una fonte di fosforo organico e cobalamina come supplemento per aumentarne la disponibilità nel corpo potrebbe migliorare la spermatogenesi e la qualità del seme in stalloni subfertili o senili (Penino et al., 2015).

Nel nostro studio abbiamo voluto valutare se, come nelle altre specie per il seme congelato, l'aggiunta della B12 all'extender utilizzato nel seme refrigerato sia utile per migliorare i parametri di vitalità, motilità totale ed integrità dell'acrosoma rispetto ad uno stesso seme refrigerato ma non sembra esserci uno specifico dosaggio che apporta solo benefici, diversamente dagli altri studi effettuati sulla cobalamina, o dei miglioramenti statisticamente rilevanti se non per quanto riguarda la funzionalità di membrana rispetto al seme fresco. A seconda della concentrazione, sono stati riscontrati effetti positivi e negativi (Hu et al., 2009).

L'unico parametro che ha mostrato dei valori statisticamente rilevanti è quello valutato dal test HOS, dove tutti i campioni trattati e CTRL a T24 avevano valori superiori a CTRL T0 determinando quindi un marcato miglioramento della funzionalità di membrana. La funzionalità di membrana è essenziale per il processo di fecondazione e, come tale, è una caratteristica del seme fondamentale da valutare (Neild et al., 2000). È importante sottolineare però che B, C e D non differivano dal campione A, sottolineando che dosaggi superiori a 1.25 mg/mL non apportano vantaggi per questo parametro.

Per quanto i campioni B riportino valori superiori per molte delle caratteristiche analizzate, si è visto un netto peggioramento rispetto a CTRL a T0 e a T24, A, C e D per l'integrità dell'acrosoma. Questo risultato ci fa supporre che l'aggiunta di 2.50 mg/mL di B12 non aiuta a salvaguardarne l'integrità ma piuttosto contribuisce allo stress che induce la reazione acrosomiale, normalmente prevista al momento della fecondazione dell'ovulo. Per stabilire se è un problema legato al dosaggio oppure ad altri fattori sarebbe utile ripetere lo studio ampliando il numero di soggetti e il tipo di razze prese in considerazione. Tutti gli altri campioni trattati, inoltre, presentavano valori inferiori a CTRL a T0 facendo supporre che la cobalamina tende a non apportare un miglioramento dell'integrità dell'acrosoma.

I valori ottenuti per %ACR però non corrispondono con quelli ottenuti per la morfologia in quanto, sia CTRL a T24 che A, C e D, hanno dato valori superiori a CTRL a T0 e solamente B aveva valori nettamente inferiori a tutti gli altri esattamente come per l'integrità dell'acrosoma. Questi valori non corrispondono alla normalità in

quanto solitamente la membrana plasmatica viene danneggiata prima dell'acrosoma; invece, nel nostro scenario gli spermatozoi aventi la membrana post acrosomiale intatta, quindi considerati vivi, vengono successivamente danneggiati dall'acrosoma. È possibile ritenere che vi sia più un cambiamento metabolico che non strutturale che determina maggiori difetti della testa degli spermatozoi.

Nonostante per la maggior parte dei parametri considerati non vi sia stato un miglioramento statisticamente rilevante, è stata osservata una motilità totale maggiore del 10% o superiore per ogni campione trattato rispetto a CTRL a T24 in ogni stallone sottoposto all'indagine.

I dosaggi stabiliti ed applicati durante lo studio si basano sulle sperimentazioni condotte sui tori dove si sono visti i migliori risultati per quanto riguarda una maggiore motilità e vitalità del seme e integrità dell'acrosoma (Mizera et al., 2019; Hu et al., 2009).

Nonostante ciò, è bene considerare che, nel nostro studio, dosaggi superiori a 2.50 mg/mL hanno apportato aumenti nettamente inferiori rispetto a B o a CTRL a T24 per quasi tutti i parametri qualitativi.

Hu ed i colleghi (2009) hanno riportato che un'alta concentrazione di B12 (3.75 mg/mL) ha un effetto debilitante sugli spermatozoi di toro ma l'esatto meccanismo degli effetti positivi e negativi delle dosi di vitamina B12 sulle caratteristiche del seme richiede uno studio dettagliato per comprendere meglio il suo preciso ruolo fisiologico in riproduzione (Mizera et al., 2019).

Per quanto riguarda l'utilizzo del seme trattato con la B12 per la fecondazione in vitro e in vivo, vi è un solo studio che attualmente ha testato l'integrazione di cobalamina nel mezzo di crioconservazione utilizzato nel seme di bufalo per le fecondazioni in vitro ed ha ottenuto una variazione nella proporzione di spermatozoi vivi o morti probabilmente grazie ad una maggiore attività antiossidante (Ahmed et al., 2021). Durante la crioconservazione ci sono delle incongruenze tra le concentrazioni di enzimi antiossidanti endogeni e lo scavenging di competenza degli spermatozoi (O'Flaherty et al., 2006).

Nello studio di Ahmed e colleghi, i campioni di seme di bufalo sono stati preparati integrando 2, 4 e 5 mg/mL di B12 e hanno mostrato delle concentrazioni inferiori di perossidazione lipidica (LPO) nel plasma seminale rispetto al campione di controllo. Allo stesso modo le concentrazioni di ROS erano inferiori nei campioni di seme con 5 mg/mL di B12 rispetto al controllo. L'esito è stato pertinente con la capacità antiossidante della B12 grazie allo scavenging di LPO e ROS durante la

crioconservazione degli spermatozoi di bufalo. L'integrazione di vitamina B12 nel mezzo di crioconservazione allevia gli effetti dannosi sulle funzioni cinetiche, enzimi antiossidanti plasmatici seminali e le concentrazioni di ATP. Inoltre, il tasso di scissione è stato aumentato grazie alla vitamina B 12 integrata nel mezzo di crioconservazione, ciò può verificarsi come conseguenza dell'inibizione dello sviluppo di maggiori quantità ottimali di LPO nel plasma seminale e ROS negli spermatozoi di bufalo (Ahmed et al., 2021).

La più grande fonte di energia cellulare è l'ATP che viene utilizzata dagli spermatozoi per la motilità e la capacitazione all'interno del tratto riproduttivo femminile e durante i processi tramite cui gli spermatozoi si legano agli ovociti e penetrano al loro interno (du Plessis et al., 2015).

Nello studio di Ahmed e dei colleghi viene indicato che l'integrazione di 5 mg/mL di B12 nel mezzo di crioconservazione determina una maggiore concentrazione di ATP nel plasma seminale rispetto al campione di controllo e a quello con 1 mg/mL di B12 integrata. Vi sono diversi studi che hanno valutato la possibile relazione tra l'ATP plasmatico seminale e la fertilità, ma, nonostante Garrett e i colleghi (2008) abbiano confermato questa ipotesi tramite il loro studio sui tori, è stata smentita successivamente l'associazione tra fertilità del seme e contenuto di ATP (Berg et al., 2018). Si suggerisce, quindi che l'integrazione di B12 nel mezzo di crioconservazione consente l'attivazione delle strutture degli spermatozoi di bufalo correlate alla loro motilità e protegge le riserve di ATP mitocondriale durante i processi di crioconservazione (Ahmed et al., 2006).

La coltura in vitro degli embrioni è facilmente influenzata dallo stress ossidativo, causato dai ROS (Takahashi et al., 2012). L'utilizzo dell'ossigeno da parte delle cellule epiteliali oviduttali comporta delle concentrazioni relativamente minori di ossigeno per lo sviluppo embrionale precoce e, infine, per la capacità antiossidante endogena in vivo (Guérin et al., 2001).

Gli ovociti trattati con i campioni di seme crioconservato integrati con 5 mg/mL di B12 presentavano un maggior tasso di scissione rispetto agli ovociti inseminanti con il campione di controllo. Questo miglioramento del tasso di scissione può essere determinato dalle spiccate capacità antiossidanti della cobalamina che comportano condizioni favorevoli per alleviare lo stress ossidativo e LPO negli spermatozoi di bufalo durante i processi di congelamento e scongelamento (Ahmed et al., 2006).

L'esito dello studio sopra citato fa presupporre che l'utilizzo della B12, ad un dosaggio adeguato, comporti un maggior tasso di fecondazione quantomeno in vitro e fa sperare in un miglioramento anche in vivo ma sono necessari ulteriori studi nelle diverse specie. Altri fattori da valutare, quando si prende in considerazione l'utilizzo della cobalamina negli extender, sono il costo della conservazione del seme trattato e la colorazione del seme dopo l'aggiunta della B12. Per quanto riguarda la refrigerazione del seme comporta sicuramente un costo maggiore rispetto all'utilizzo del seme fresco, soprattutto nel caso in cui si renda necessario il trasporto con corriere della dose inseminante, ma sarà più conveniente rispetto al seme congelato che richiede una spesa per lo stoccaggio delle paillettes oltre ai normali costi di lavorazione e gestione del seme. Il fattore, però, che potrebbe essere maggiormente discriminante è la colorazione rosa shocking che ottiene il seme dopo l'aggiunta della cobalamina. Un proprietario o allevatore che riceverà la dose inseminante trattata dovrà, quindi, essere adeguatamente informato dal medico veterinario in modo tale da non allarmarsi al momento della consegna. È anche possibile che vi siano dei clienti che per scetticismo o concezioni retrograde siano restii ad utilizzare un seme che si presenta in queste condizioni ma è compito del professionista adoperarsi per esporre i benefici che ne derivano dall'uso. Sebbene le metodiche utilizzate nel nostro studio siano frequentemente adoperate per l'analisi qualitativa del seme e in ambito riproduttivo, sarebbe interessante ripetere la sperimentazione ricorrendo alla citofluorimetria. La citometria a flusso (FCM) è una potente tecnica molecolare che ha la capacità di misurare con precisione e in poco tempo diversi marcatori (Omran et al., 2021). In un laboratorio di andrologia, può essere utilizzato per differenziare tra le diverse anomalie del DNA, identificare i marcatori dell'apoptosi e rilevamento di anticorpi antispermatozoi (Omran et al., 2013). I principi di FCM dipendono dal calcolo del rapporto tra DNA a singolo e doppio filamento nei nuclei degli spermatozoi colorato con una colorazione fluorescente. Durante FCM, l'esposizione all'acido di solito provoca la denaturazione del DNA a doppio filamento negli spermatozoi che presentano la struttura della cromatina alterata (Ehemann et al., 1999; Ehemann et al., 2003). Il miglioramento della tecnologia di FCM, ora più user-friendly, ha permesso lo sviluppo di un gran numero di prove per la valutazione in campo dei parametri di qualità del seme (Barrier Battut et al., 2016; Peña et al., 2016). Le analisi eseguite utilizzando la citometria a flusso hanno migliorato notevolmente le previsioni di fertilità (Barrier Battut et al., 2017). Come si è visto nello studio condotto da Barrier Battut e i colleghi, grazie alla FCM è stato possibile



individuare alcuni stalloni che potrebbero essere subfertili nonostante un'elevata motilità post-scongelo, in quanto gli spermatozoi hanno mostrato difetti relativi alla reattività acrosomiale, integrità del DNA o resistenza iposmotica.

Lo studio condotto da Bulkeley e colleghi è il primo che ha valutato la relazione tra la morfologia e la produzione di ROS a livello unicellulare nel seme di stallone utilizzando la FCM, vi sono però studi che valutano le misure di stress ossidativo e qualità del seme, compresa la valutazione morfologica, a livello di eiaculato (Aziz et al., 2004).

La variazione nella produzione di ROS inter-stalloni e inter-eiaculazioni è stata segnalata in diversi studi, sia nel seme refrigerato che nel congelato (Johannisson et al., 2014; Bulkeley et al., 2022). I risultati dello studio di Bulkeley e dei colleghi sulle morfologie anormali e la produzione di ROS hanno potenziali implicazioni per la fertilità dello stallone. Un precedente studio ha trovato la percentuale di spermatozoi morfologicamente normali altamente correlata con la fertilità valutata secondo il tasso di gravidanza (PC) e percentuale di gravidanza al primo ciclo (FCP). Hanno inoltre scoperto che se aumentavano i livelli di anomalie morfologiche della maggior parte degli spermatozoi (comprese teste anormali e distaccate, goccioline prossimali e distali, anomalie generali del segmento intermedio e code a spirale) vi era associato un calo di PC e FCP (Love et al., 2011).

Uno studio di Morrell e colleghi ha anche identificato una relazione positiva tra morfologia normale e tasso di gravidanza; inoltre, hanno valutato i danni ossidativi al DNA utilizzando l'Analisi della Struttura della Cromatina Spermatica (SCSA), che ha rivelato una correlazione negativa tra l'indice di frammentazione del DNA (DFI) e il tasso di gravidanza.

In alcune anomalie morfologiche (AH, PD, AM e CTM), analizzate nello studio di Bulkeley e colleghi, è stata dimostrata un'elevata produzione di ROS in spermatozoi vitali rispetto alle cellule morfologicamente normali. È noto che la produzione di ROS causa danni alle cellule spermatiche; infatti, eiaculati con un'ampia percentuale di ROS potrebbero essere meno adatti allo stoccaggio in refrigerazione. Il marcato aumento della produzione di ROS negli spermatozoi CTM che hanno osservato ne ha limitato l'analisi al solo seme fresco in quanto era possibile identificare pochissime cellule CTM vive nel seme refrigerato. È possibile che l'elevata produzione di ROS negli spermatozoi con CTM provochi morte cellulare prematura precludendone la valutazione a causa della mancanza di un campione statisticamente significativo.

L'utilizzo di coloranti a fluorescenza, come per esempio i tioli, per un'indagine simultanea dello stato antiossidante cellulare, il potenziale di membrana mitocondriale e la generazione di ROS potrebbero fornire preziose informazioni sul ruolo del metabolismo ossidativo mitocondriale con elevata produzione di ROS nel seme morfologicamente anormale. Inoltre, l'uso automatizzato di coloranti a membrana consentirebbe la valutazione dei dati morfologici con FCM da parte del software IDEAS<sup>®</sup> che permetterebbe di migliorare l'efficienza di analisi dei dati (Bulkeley et al., 2022). Infine, è bene tenere presente che questa metodica, per quanto apporti numerosi benefici nell'analisi del seme e sarebbe estremamente utile nell'analisi del seme trattato con la B12, richiede una strumentazione estremamente costosa e del personale altamente qualificato.

## 5. CONCLUSIONI

Gli studi effettuati non hanno consentito di confermare il miglioramento di tutti i parametri qualitativi del seme di stallone refrigerato a +4°C per 24 ore grazie all'aggiunta di vitamina B12 nell'extender, come invece riscontrato per il seme congelato nelle altre specie. Tuttavia, si è visto è un miglioramento statisticamente rilevante della funzionalità di membrana per ogni campione trattato e un incremento del 10% o oltre della motilità all'aumentare del dosaggio. Per quanto riguarda i parametri relativi alla velocità e i movimenti laterali della testa si è visto un miglioramento progressivo con l'aumentare del dosaggio di B12. I campioni con 2.50 mg/mL di cobalamina presentavano i valori più alti per la linearità e la rettilineità mentre mostravano i valori peggiori per la morfologia. Infine, per quanto concerne l'integrità dell'acrosoma i campioni trattati con 1.25 mg/mL di B12 mantenevano dei valori simili al controllo ma con l'aumentare del dosaggio vi era un progressivo peggioramento. Sulla base dei dati ottenuti, quindi, non è possibile individuare uno specifico dosaggio che apporta dei miglioramenti a tutti i parametri considerati.

Nonostante l'uso della vitamina B12 non abbia decretato un incremento qualitativo del seme sarebbe sicuramente utile ripetere lo studio ampliando il numero dei soggetti esaminati differenti per età e considerando di inserire più razze diverse in modo tale da confrontare i valori non solamente sulla base dei diversi dosaggi di cobalamina utilizzati ma anche, e soprattutto, sulla base della razza di appartenenza dello stallone.

Infine, sebbene la valutazione dei parametri qualitativi del seme ci fornisca una previsione sulla fertilità dello sperma che vogliamo utilizzare non garantisce alcun esito favorevole quando lo si utilizza in vitro o in vivo. L'unico studio che attualmente ha utilizzato del seme trattato con la B12 per effettuare delle inseminazioni in vitro è quello condotto da Ahmed e colleghi che ha potuto constatare una maggiore scissione degli ovociti inseminati con campioni di seme crioconservato e cobalamina rispetto al controllo. Il risultato dello studio sopracitato pone dei buoni presupposti sull'esito di un'eventuale sperimentazione in vitro ma si rende comunque necessario uno studio in vivo e in vitro utilizzando il seme di stallone, sia refrigerato che congelato, con l'aggiunta di B12 all'extender per valutare un reale incremento del tasso di concepimento.



## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Abad, C., Amengual, M. J., Gosálvez, J., Coward, K., Hannaoui, N., Benet, J., García-Peiró, A., & Prats, J. (2013). Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrologia*, 45(3), 211–216.
2. Ahmadi Hamedani, M., Hamedani, M., Tahmasbi, A., & Ahangari, Y. (2013). Effects of vitamin B 12 supplementation on the quality of Ovine spermatozoa. *Open Veterinary Journal*, 3(2), 2226–4485.
3. Ahmed, H., Jahan, S., Riaz, M., Ijaz, M. U., & Wahab, A. (2021). Improving the quality and in vitro fertilization rate of frozen-thawed semen of buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls with the inclusion of vitamin B12 in the cryopreservation medium. *Animal Reproduction Science*, 229.
4. Allen, L. H., Miller, J. W., de Groot, L., Rosenberg, I. H., Smith, A. D., Refsum, H., & Raiten, D. J. (2018). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND): Vitamin B-12 Review. In *Journal of Nutrition* (Vol. 148, pp. 1995S-2027S). Oxford University Press.
5. Ames, B. N. (2006). *Low micronutrient intake may accelerate the degenerative diseases of aging through allocation of scarce micronutrients by triage.*
6. Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 65–75.
7. Aurich, J., Kuhl, J., Tichy, A., & Aurich, C. (2020). Efficiency of semen cryopreservation in stallions. *Animals*, 10(6), 1–13.
8. Aziz, N., Saleh, R. A., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2004). *Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index.*
9. Bailey, J. L., Bilodeau, J.-F. O., & Cormier, N. (2000). Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. *Journal of Andrology*, 21(1).
10. Banihani, S. A. (2017). Vitamin B12 and semen quality. In *Biomolecules* (Vol. 7, Issue 2). MDPI AG.
11. Barrier Battut, I., Kempfer, A., Becker, J., Lebailly, L., Camugli, S., & Chevrier, L. (2016). Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology*, 86(4), 1111–1131.

12. Battut, I. B., Kempfer, A., Lemasson, N., Chevrier, L., & Camugli, S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, *97*, 186–200.
13. Beltrame, F. L., de Santi, F., Vendramini, V., Cabral, R. E., Miraglia, S. M., Cerri, P. S., & Cerri, E. S. (2019). Vitamin B12 prevents cimetidine-induced androgenic failure and damage to sperm quality in rats. *Frontiers in Endocrinology*, *10*(APR).
14. Berg, H. F., Kommisrud, E., Bai, G., Gaustad, E. R., Klinkenberg, G., Standerholen, F. B., Thorkildsen, L. T., Waterhouse, K. E., Ropstad, E., Heringstad, B., & Alm-Kristiansen, A. H. (2018). Comparison of sperm adenosine triphosphate content, motility and fertility of immobilized and conventionally cryopreserved Norwegian Red bull semen. *Theriogenology*, *121*, 181–187.
15. Boxmeer, J. C., Smit, M., Weber, R. F., Lindemans, J., Romijn, J. C., Eijkemans, M. J., Macklon, N. S., & Steegers-Theunissen, R. P. (2007). Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in men undergoing IVF or ICSI procedures. *Journal of Andrology*, *28*(4), 521–527.
16. Brahem, S., Jellad, S., Ibala, S., Saad, A., & Mehdi, M. (2012). DNA fragmentation status in patients with necrozoospermia. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *58*(6), 319–323.
17. Brasileiro, L. S., Segabinazzi, L. G. T. M., Menezes, E., Salgueiro, C. C., Novello, G., Scheeren, V. F. da C., Alvarenga, M. A., & Nunes, J. F. (2019). Coconut Water as an Extender Component for Cooled Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, *78*, 69–73.
18. Brito, A., Grapov, D., Fahrman, J., Harvey, D., Green, R., Miller, J. W., Fedosov, S. N., Shahab-Ferdows, S., Hampel, D., Pedersen, T. L., Fiehn, O., Newman, J. W., Uauy, R., & Allen, L. H. (2017). The human serum metabolome of vitamin B-12 deficiency and repletion, and associations with neurological function in elderly adults. *Journal of Nutrition*, *147*(10), 1839–1849.
19. Bulkeley, E., Santistevan, A. C., Varner, D., & Meyers, S. (2022). Imaging flow cytometry to characterize the relationship between abnormal sperm morphologies and reactive oxygen species in stallion sperm. *Reproduction in Domestic Animals*.
20. Carmel, R. (2013). Diagnosis and management of clinical and subclinical cobalamin deficiencies: Why controversies persist in the age of sensitive metabolic testing. In *Biochimie* (Vol. 95, Issue 5, pp. 1047–1055).

21. Cazales, N., Santos, G. O., Farias, M., Bastos, H. B. A., Winter, G. H. Z., Bustamante-Filho, I. C., & Mattos, R. C. (2012). *Effect of intramuscular injection of butaphosphan and vitamin B12 on the quality of fresh and cooled stallion semen.*
22. Contreras, M. J., Treulen, F., Arias, M. E., Silva, M., Fuentes, F., Cabrera, P., & Felmer, R. (2020). Cryopreservation of stallion semen: Effect of adding antioxidants to the freezing medium on sperm physiology. *Reproduction in Domestic Animals*, *55*(2), 229–239.
23. Desai, N., Sharma, R., Makker, K., Sabanegh, E., & Agarwal, A. (2009). Physiologic and pathologic levels of reactive oxygen species in neat semen of infertile men. *Fertility and Sterility*, *92*(5), 1626–1631.
24. Dhillon, V. S., Shahid, M., & Husain, S. A. (2007). Associations of MTHFR DNMT3b 4977 bp deletion in mtDNA and GSTM1 deletion, and aberrant CpG island hypermethylation of GSTM1 in non-obstructive infertility in Indian men. *Molecular Human Reproduction*, *13*(4), 213–222.
25. du Plessis, S. S., Agarwal, A., Mohanty, G., & van der Linde, M. (2015). Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? In *Asian Journal of Andrology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 230–235). Medknow Publications.
26. Ehemann, V., Hashemi, B., Lange, A., & Otto, H. F. (1999). *Flow cytometric DNA analysis and chromosomal aberrations in malignant glioblastomas.*
27. Ehemann, V., Sykora, J., Vera-Delgado, J., Lange, A., & Otto, H. F. (2003). Flow cytometric detection of spontaneous apoptosis in human breast cancer using the TUNEL-technique. *Cancer Letters*, *194*(1), 125–131.
28. Einarsson, S., Dalin, A. M., & Lundeheim, N. (2009). Sperm production and sperm morphology of Swedish Warmblood stallions. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(1), 33–36.
29. Eskenazi, B., Kidd, S. A., Marks, A. R., Slotter, E., Block, G., & Wyrobek, A. J. (2005). Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy men. *Human Reproduction*, *20*(4), 1006–1012.
30. Fernández, J. L., Muriel, L., Teresa Rivero, M., Goyanes, V., Vazquez, R., & Alvarez, J. G. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. In *Journal of Andrology* (Vol. 24, Issue 1).
31. Firth, J., Stubbs, B., Sarris, J., Rosenbaum, S., Teasdale, S., Berk, M., & Yung, A. R. (2017). The effects of vitamin and mineral supplementation on symptoms of schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. In *Psychological Medicine* (Vol. 47, Issue 9, pp. 1515–1527). Cambridge University Press.

32. Flesch, F. M., & Gadella, B. M. (2000). *Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization*.
33. Gadella, B. M., Rathi, R., Brouwers, J. F. H. M., Stout, T. A. E., & Colenbrander, B. (2001). Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. In *Animal Reproduction Science* (Vol. 68).
34. Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., & Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. In *Human Reproduction* (Vol. 15, Issue 4).
35. Garrett, L. J. A., Revell, S. G., & Leese, H. J. (2008). Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. *Journal of Andrology*, 29(4), 449–458.
36. Guasti, P. N., Souza, F. F., Scott, C., Papa, P. M., Camargo, L. S., Schmith, R. A., Monteiro, G. A., Hartwig, F. P., & Papa, F. O. (2020). Equine seminal plasma and sperm membrane: Functional proteomic assessment. *Theriogenology*, 156, 70–81.
37. Guérin, P., Mouatassim, S. el, Me, Y., & Âzo, Â. (2001). *Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings*.
38. Hillyer, L. L., Ridd, Z., Fenwick, S., Hincks, P., & Paine, S. W. (2018). Pharmacokinetics of inorganic cobalt and a vitamin B12 supplement in the Thoroughbred horse: Differentiating cobalt abuse from supplementation. *Equine Veterinary Journal*, 50(3), 343–349.
39. Hosseinabadi, F., Jenabi, M., Ghafarizadeh, A. A., & Yazdanikhah, S. (2020). The effect of vitamin B12 supplement on post-thaw motility, viability and DNA damage of human sperm. *Andrologia*, 52(11).
40. Hu, J. H., LI, Q. W., Chen, Y. L., Jiang, Z. L., Jia, Y. H., Wang, L. Q., & Ou, B. B. (2009). Effects of addition of vitamin B12 to the extender on post-thaw motility, acrosome morphology, and plasma membrane integrity in bull semen. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 33(5), 379–384.
41. Hu, J. H., Tian, W. Q., Zhao, X. L., Zan, L. S., Xin, Y. P., & Li, Q. W. (2011). The Cryoprotective Effects of Vitamin B12 Supplementation on Bovine Semen Quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 66–73.
42. Iwasaki, A., & Gagnon, C. (1992). *FERTILITY AND STERILITY Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients\** (Vol. 57, Issue 2).
43. Johannisson, A., Lundgren, A., Humblot, P., & Morrell, J. M. (2014). Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. *Animal*, 8(10), 1706–1714.



44. Ko, E. Y., Siddiqi, K., Brannigan, R. E., & Sabanegh, E. S. (2012). Empirical medical therapy for idiopathic male infertility: A survey of the American urological association. *Journal of Urology*, 187(3), 973–978.
45. Lehninger, Albert L., 1976. Capitolo 13, 20-21. In: *Vitamine, coenzimi, ormoni*. Bologna: Zanichelli.
46. Lippi, G., Franchini, M., & Guidi, G. C. (2006). Blood doping by cobalt. Should we measure cobalt in athletes? *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 1(1).
47. McKinnon, Angus O., Squires, Edward L., Vaala, Wendy E., Varner, Dickson D. 2011; 2° edizione. Capitolo 95 – Functional Anatomy of the Adult Male, ed. R. P. Amann, 867, 869-872, 874-875. Capitolo 96 - Physiology and Endocrinology, ed. R. P. Amann, 883-886, 892-900, 904. Capitolo 98 - Oxidative Stress in Sperm, ed. B. A. Ball, 991-993. Capitolo 99 - Endocrine-Paracrine-Autocrine Regulation of Reproductive Function in the Stallion, ed. J. F. Roser, 996-999, 1003, 1008-1009. Capitolo 101 – Spermatogenesis, ed. L. Johnson, C. E. Griffin and M. T. Martin, 1026-1038, 1048. Capitolo 102 – Spermatozoa Function, ed. R. P. Amann and J. K. Graham, 1054-1061, 1065-1066. In: *Equine reproduction, Volume 1, Part II*. John Wiley & Sons; Incorporated.
48. Mislei, B., Bucci, D., Malama, E., Bollwein, H., & Mari, G. (2020). Seasonal changes in ROS concentrations and sperm quality in unfrozen and frozen-thawed stallion semen. *Theriogenology*, 144, 89–97.
49. Mizera, A., Kuczaj, M., Szul, A., & Jedraszczyk, J. (2019). Influence of addition of cobalamin to the extender on the post-thaw motility, viability, and DNA integrity of bovine ejaculate. *Medycyna Weterynaryjna*, 75(3), 164–166.
50. Morrell, J. M., Johannisson, A., Dalin, A. M., Hammar, L., Sandebert, T., & Rodriguez-Martinez, H. (2008). Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50(1).
51. Nago, M., Arichi, A., Omura, N., Iwashita, Y., Kawamura, T., & Yumura, Y. (2021). Aging increases oxidative stress in Semen. *Investigative and Clinical Urology*, 62(2), 233–238.
52. Najafipour, R., Moghbelinejad, S., Aleyasin, A., & Jalilvand, A. (2017). Effect of B9 and B12 vitamin intake on semen parameters and fertility of men with MTHFR polymorphisms. *Andrology*, 5(4), 704–710.
53. Najjar, A., ben Said, S., Benaoun, B., Chetoui, C., Ezzaouia, M., & ben Mrad, M. (2013). Sperm Abnormalities in Post-thawed Semen of Tunisian Arab Stallions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*.

54. Neild, D., Chaves, G., Flores, M., Mora, N., Beconi, M., & Agüero, A. (1999). *HYPOOSMOTIC TEST IN EQUINE SPERMATOZOA*.
55. Neild, D. M., Chaves, M. G., Flores, M., Miragaya, M. H., Gonzalez, E., & Agüero, A. (2000). The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. In *andrologia* (Vol. 32).
56. Noakes, David E., Parkinson, Timothy J., England, Gary C. W. 2019;10th Edition. Capitolo 35 – Evaluation of the Fertility of Breeding Males, ed. M. McGowan, 625, 628-632. Capitolo 36 – Abnormalities Affecting Reproductive Function of Male Animals, ed. T. J. Parkinson and M. McGowan, 659-663. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics, Part 5*. Capitolo 43 – Artificial Insemination, ed. T. J. Parkinson and J. M. Morrell, 746-749, 768-770. In: *Veterinary Reproduction and Obstetrics, Part 7*. Elsevier.
57. O’Flaherty, C., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 41, Issue 4, pp. 528–540).
58. Omran, H. M., Bakhiet, M., & Dashti, M. G. (2013). DNA integrity is a critical molecular indicator for the assessment of male infertility. *Molecular Medicine Reports*, 7(5), 1631–1635.
59. Omran, H. M., Bakhiet, M., & Ehemann, V. (2021). Flow Cytometry Detection of Sperm DNA Fragmentation and Apoptotic Markers in the Semen of Infertile Males. *International Journal of Reproductive Medicine*, 2021, 1–8.
60. Peña, F. J., Ortega Ferrusola, C., & Martín Muñoz, P. (2016). New flow cytometry approaches in equine andrology. In *Theriogenology* (Vol. 86, Issue 1, pp. 366–372). Elsevier Inc.
61. Penino, N. C., Santos, G. D. O., Rodrigues, M. F., Bastos, H. B. D. A., Winter, G. H. Z., Bustamante-Filho, I. C., Pimentel, A. M., Gregory, R. M., & Mattos, R. C. (2015). Effect of intramuscular injection of butafosfan and cobalamin on the quality of Fresh and Cooled Stallion Semen. *Semina: Ciências Agrárias*, 36(4), 2603–2610.
62. Pnas, B. E. (2006). *Advancing age has differential effects on DNA damage, chromatin integrity, gene mutations, and aneuploidies in sperm* (Vol. 103, Issue 25).
63. Randaccio, L., Geremia, S., Demitri, N., & Wuerges, J. (2010). Vitamin B12: Unique metalorganic compounds and the most complex vitamins. In *Molecules* (Vol. 15, Issue 5, pp. 3228–3259).
64. Runcan, E. E., Pozor, M. A., Zambrano, G. L., Benson, S., & Macpherson, M. L. (2014). Use of two conventional staining methods to assess the acrosomal status of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*, 46(4), 503–506.

65. Saxena, S., Shukla, D., Saxena, S., Khan, Y. A., Singh, M., Bansal, A., Sairam, M., & Jain, S. K. (2010). Hypoxia preconditioning by cobalt chloride enhances endurance performance and protects skeletal muscles from exercise-induced oxidative damage in rats. *Acta Physiologica*, 200(3), 249–263.
66. Sjaastad, O. V., Sand, O., Hove, K. 2013; Edizione italiana a cura di C. Tamanini. Capitolo 9 – Il sangue e le sue funzioni, 309-311 In: *Fisiologia degli animali domestici*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana
67. Suwimonteerabutr, J., Chumsri, S., Tummaruk, P., & Nuntapaitoon, M. (2020). Butaphosphan and Cyanocobalamin Supplementation in Semen Extender on Chilled Boar Sperm Quality and Life Span. *Frontiers in Veterinary Science*, 7.
68. Takahashi, M. (2012). SRD Innovative Technology Award 2011 Oxidative Stress and Redox Regulation on In Vitro Development of Mammalian Embryos. In *Journal of Reproduction and Development* (Vol. 58, Issue 1).
69. Tariq, H., Zahid, N., Amir, D., Ashraf, M., Aftab, M. A., Yousaf, S., & Rehman, R. (2021). Estimation of folic acid/micro nutrients levels; Does it reflect sperm parameters. *International Journal of Clinical Practice*, 75(3).
70. Terai, K., Horie, S., Fukuhara, S., Miyagawa, Y., Kobayashi, K., & Tsujimura, A. (2020a). Combination therapy with antioxidants improves total motile sperm counts: A Preliminary Study. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(1), 89–94.
71. Terai, K., Horie, S., Fukuhara, S., Miyagawa, Y., Kobayashi, K., & Tsujimura, A. (2020b). Combination therapy with antioxidants improves total motile sperm counts: A Preliminary Study. *Reproductive Medicine and Biology*, 19(1), 89–94.
72. Thakkar, K., & Billa, G. (2015). Treatment of vitamin B12 deficiency-methylcobalamine? Cyanocobalamine? Hydroxocobalamin? - Clearing the confusion. In *European Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 69, Issue 1, pp. 1–2). Nature Publishing Group.
73. van de Lagemaat, E. E., de Groot, L. C. P. G. M., & van den Heuvel, E. G. H. M. (2019). Vitamin B 12 in relation to oxidative stress: A systematic review. In *Nutrients* (Vol. 11, Issue 2). MDPI AG.