



Università degli studi di Padova

Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di laurea Specialistica a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**EFFETTI DELL'AGGIUNTA DI PLASMA
SEMINALE POST-SCONGELAMENTO SULLA
MOTILITA' E SULL'INTEGRITA' DI MEMBRANA
DEL SEME EQUINO**

Relatore: **Dott. Antonio Mollo**

Correlatore: **Prof. Fernando J. Peña Vega**

Laureando: **Matteo Mainardi**

Matricola: 527333/MV

Anno Accademico 2008/2009

Indice

Introduzione.....	1
Seme equino.....	3
La vagina artificiale.....	8
Prelievo di seme.....	11
Motilità del seme.....	16
Citofluorimetria a flusso.....	21
Diluenti.....	30
Scopo.....	31
Materiali e metodi.....	32
Analisi della motilità spermatica.....	32
Citofluorimetria a flusso.....	33
Yo-Pro-1 e Omodimero di etidio-1.....	34
Congelamento del seme.....	35
Scongelo del seme.....	36
Protocollo sperimentale.....	37
Analisi statistiche.....	39
Risultati.....	40
Discussione e conclusione.....	47
Appendice.....	51
Gli stalloni.....	52
Il cavallo Andaluso o Pura razza Spagnola.....	52
Cavallo Anglo-Arabo Spagnolo.....	53
Cavallo Anglo-Arabo Francese.....	54
BEDELIO.....	55
CALIFA XXXVI.....	55
RANCHERO.....	55
FEU ARDENT.....	55
GIRALDILLO- RAM.....	56

CHOCOLATE.....	56
Bibliografia.....	57
Ringraziamenti.....	61

Introduzione

In molti Paesi, soprattutto del Nord America ma più di recente anche in Europa, l'inseminazione artificiale (AI) è diventata, nell'ambito della riproduzione equina, la tecnica d'elezione per ottenere nuovi puledri tanto che la monta naturale occupa attualmente, per molte razze, un ruolo marginale. L'utilizzo di seme scongelato tuttavia, non ha ancora raggiunto un livello di diffusione tanto elevato a causa dei bassi tassi di gravidanza mediamente riscontrati nelle fattrici inseminate con questa tecnica. Oltre alla qualità del seme, numerosi altri fattori influiscono sul buon esito dell'inseminazione artificiale, inclusi la manipolazione e le tecniche di congelamento del seme, la dose, il momento dell'AI, la gestione e la fertilità delle fattrici. C'è una considerevole variabilità fra i singoli stalloni nella qualità del seme e nella sopravvivenza dello stesso al congelamento e scongelamento. *Tischner* (1979) ha stimato che approssimativamente il 20% degli stalloni sono "good-freezer" (buoni congelatori) e un altro 20% sono "bad-freezer" (cattivi congelatori), mentre la maggior parte degli stalloni, producono un seme che di solito è valutato negativamente, però può essere congelato usando tecniche specifiche. Nel campo della riproduzione equina non sono ancora stati definiti dei protocolli fissi e certi per il congelamento del seme, come per esempio avviene già da alcuni anni per la riproduzione bovina. Tutto ciò è determinato da diversi fattori quali le incomplete conoscenze riguardo gli effetti del congelamento sulla qualità del seme, la varietà di diluenti o extenders e crioprotettori presenti attualmente in commercio, l'utilizzo di alcuni parametri del seme che non sono fortemente correlati con la fertilità, primo fra tutti la motilità (*Kuisma et al*, 2006). Elemento che accomuna i vari protocolli di congelamento è l'eliminazione del plasma seminale di solito tramite

centrifugazione, dal seme stesso prima del congelamento. Sono stati compiuti diversi studi sul plasma seminale e quasi tutti gli autori sembrerebbero convenire sull'influenza negativa che questo esercita sul seme sia prima che durante e dopo il congelamento. *Sieme* (2004) sostiene che la motilità del seme è superiore nella frazione ricca di spermatozoi e che è stata centrifugata, piuttosto che in quella non centrifugata; *Amann and Pickett* (1997) sembrano convenire su questa tesi affermando che la rimozione del plasma seminale è necessaria per la sopravvivenza delle cellule spermatiche al congelamento. Nella loro indagine *Moore e Squires* (2004) invece, non riscontrano differenze nella motilità, nell'integrità della membrana acrosomiale e nell'integrità della membrana plasmatica (percentuale di vivi/morti) dopo l'incubazione con plasma seminale a differenti concentrazioni (20, 40, 60, 80 %) anche se sostengono che la motilità è influenzata anche dal tempo d'incubazione e dalla temperatura di incubazione. Questi autori sostengono che la motilità più alta è stata ottenuta aggiungendo un 5 % di plasma seminale al seme scongelato, congelato dopo un tempo di 10 minuti nei quali era stato mantenuto a 4 °C. *Moore e Squires* (2004) suggeriscono che l'aggiunta di SP previene la prematura capacitazione dello sperma ed inoltre è in grado di far regredire gli spermatozoi in via di capacitazione a uno stato di non capacitazione. Un recente studio condotto da *Okazaki et al.* (2009) sul seme di verro, afferma che l'aggiunta di plasma seminale dopo lo scongelamento sembrerebbe migliorare la qualità del seme soprattutto in quei verri che hanno una bassa qualità del seme allo scongelamento. Si propone in questo lavoro la stessa idea operativa adattata ovviamente al seme equino per verificare appunto se l'aggiunta di plasma seminale al seme scongelato aumenta la qualità del seme.

Seme equino

Il seme è una sospensione cellulare contenente spermatozoi e secrezioni delle ghiandole accessorie dell'apparato genitale maschile: delle ghiandole seminali (dette anche vescichette seminali), delle ghiandole bulbouretrali e della prostata; una quarta struttura anatomica, l'ampolla, ossia l'espansione del dotto deferente prima della sua immissione nell'uretra peniena, può essere considerata un'ulteriore ghiandola accessoria. La porzione liquida che si forma durante l'eiaculazione si denomina plasma seminale.

Spermatozoi

Uno stallone adulto produce in media un volume di eiaculato compreso tra i 30 e i 200 ml, di cui solamente un 15-30% rappresenta la frazione ricca di spermatozoi. Il numero totale di spermatozoi varia tra i 5 e 15 miliardi di spermatozoi per eiaculato, mentre la concentrazione è compresa fra 150 e 300 milioni di spermatozoi per ml. (*Hafez, 1987*)

Morfologia

Lo spermatozoo equino, come qualsiasi altro spermatozoo di mammifero si compone delle seguenti strutture: una testa, in cui sono contenuti il materiale genetico e l'acrosoma; un tratto intermedio e una coda. Per quanto riguarda la testa e il nucleo dello spermatozoo equino la forma è larga e relativamente piatta. Il tratto intermedio e la coda invece mantengono la medesima forma e struttura degli altri spermatozoi di mammifero.

Composizione chimica dello spermatozoo

Esistono poche informazioni circa la composizione chimica dello spermatozoo di stallone. La percentuale di lipidi presente è del 14,2% del peso totale dello spermatozoo con un rapporto colesterolo/fosfolipidi dello 0,23. *Parks et al.* (1987) riferiscono che la membrana acrosomiale esterna e la membrana plasmatica hanno differente composizione di proteine e lipidi. E' logico pensare quindi che la compartimentazione delle differenti regioni della membrana sia data dalla differenza della composizione lipidica con le relative e specifiche funzioni. L'analisi della composizione lipidica dello sperma di verro, animale con un eiaculato simile a quello del cavallo, evidenzia che i fosfolipidi più abbondanti sono le fosfatidilcoline (63%), fosfatidil-etanol-ammine (15%), e difosfatidilcoline (10%); difosfatidilglicerolo, fosfatidilinositolo e fosfatidilserina sono presenti in minori quantità (< del 10%) (*Parks et al.* 1987). L'acido grasso docosenoico (22 carboni e 6 doppi legami) è presente solo negli spermatozoi e costituisce circa il 50% del totale degli acidi grassi dello spermatozoo. L'acido palmitico, un acido grasso saturo con 16 carboni, costituisce circa il 30% del totale degli acidi grassi dello spermatozoo, mentre l'acido miristico (14 carboni, saturo) e l'acido stearico (18 carboni, saturo) costituiscono circa il 10% del totale degli acidi grassi dello spermatozoo di verro. Le proteine rappresentano più del 50% del peso totale dello spermatozoo, inoltre la maggior parte di queste sono istoni deputati all'impacchettamento del DNA, altre svolgono funzione di enzima nell'acrosoma, altre di recettori nella membrana plasmatica, altre svolgono funzioni di canali e trasportano ioni e carboidrati e altre ancora compongono il citoscheletro della cellula spermatica. Tuttora non sono state identificate proteine specifiche di superficie negli spermatozoi dello stallone, pur essendo state individuate in altre specie attraverso tecniche di coniugazione di lectine e

anticorpi fluorescenti. Il pattern di distribuzione (quantità e posizione) di alcune di queste proteine cambia durante la maturazione nell'epididimo e durante la capacitazione. Apparentemente alcune proteine immunosoppressive del plasma seminale si legano allo spermatozoo (*Hunter et al.* 1969). Altre proteine che si originano nell'epididimo o nel plasma seminale sono rimosse dallo spermatozoo durante la capacitazione per facilitare la successiva fusione di membrana ed esposizione di recettori spermatozoo-oocita. Al giorno d'oggi la maggior parte delle funzioni delle proteine della membrana plasmatica rimangono ancora sconosciute.

Plasma seminale

Si definisce plasma seminale (PS) la miscela delle secrezioni provenienti dai testicoli, dall'epididimo e dalle ghiandole sessuali accessorie. La composizione del plasma seminale e gli effetti sulla longevità degli spermatozoi variano tra le diverse frazioni e anche tra i singoli stalloni. Gli elementi essenziali del plasma seminale, come del resto per tutti i fluidi fisiologici sono: zuccheri, proteine, enzimi ed elettroliti. Le componenti presenti in maggiore quantità sono il glucosio di derivazione ematica e l'acido citrico. Riconosciamo nel plasma seminale tre differenti tipi di proteine: le proteine trasportatrici a due o quattro fibronectine di tipo II, le proteine di secrezione ricche in cisteina (CRISP) e le spermadesine. La prostaglandina D2 sintetasi, appartenente alla classe delle lipocaline, e l'enzima convertitore dell'angiotensina I sembrano essere i due enzimi più fortemente correlati con la fertilità nello stallone. La maggior parte dei differenti elettroliti ed elementi presenti nel plasma seminale variano in concentrazione nelle varie frazioni dell'eiaculato. Nella frazione pre-spermatICA gli alti livelli di sodio e potassio sembrerebbero peggiorare la conservabilità del

seme. Nella frazione ricca di sperma invece il Calcio è presente per il 60-75% nella forma ionizzata, inoltre si riscontrano tracce di fosfato inorganico, magnesio e zinco. Le concentrazioni di rame e ferro variano fra i campioni di seme valutati normali e quelli considerati anormali. Il pH normale varia da 6.2 a 7.8 e l'osmolalità varia tra i 300-334 mOsm/Kg (*Amann e Graham, 1993*). Sebbene i dati sulle caratteristiche delle varie componenti biochimiche del plasma seminale siano stati pubblicati e siano stati compiuti progressi soprattutto nel campo della proteomica e della genetica, il ruolo fisiologico del PS non è ancora stato pienamente compreso. Senza dubbio è coinvolto in molte funzioni fisiologiche degli spermatozoi e di eventi che precedono la fecondazione: ciò che è certo è la sua principale funzione di veicolo e protezione per gli spermatozoi durante il loro tragitto all'interno dell'apparato genitale maschile e la loro entrata in quello femminile. L'ejaculato dello stallone è formato da sei a nove frazioni consecutive di sperma, con circa il 70% degli spermatozoi nei primi tre getti eiaculatori (*Kosiniak, 1975*). L'ejaculazione comincia con una frazione pre-spermatologica di consistenza acquosa proveniente in primis dalle ghiandole bulbo-uretrali, dalla prostata e dall'ampolla. Il secreto delle ghiandole bulbo-uretrali viene emesso durante l'eccitazione sessuale, concorre alla detersione del canale uretrale prima dell'ejaculazione e funge da lubrificante. Il contributo della ghiandola prostatica al volume totale dell'ejaculato di stallone varia dal 25 al 30%. Il suo secreto è acquoso e serve probabilmente a pulire l'uretra durante l'ejaculazione e costituisce la maggior parte del plasma seminale, soprattutto durante una seconda ejaculazione a 3 ore di distanza da una prima. Una delle sue funzioni è quella di rendere neutro il liquido seminale, acidificato dall'accumulo di anidride carbonica e di acido lattico metabolico, inoltre attiva gli spermatozoi eiaculati. Data la caratteristica secrezione apocrina delle cellule epiteliali prostatiche, tale secreto è ricco principalmente di enzimi, di componenti

caratteristici del citoplasma, di fibrinolisinasi e di amilasi. (Amann e Graham, 1993). La seconda frazione, ricca in spermatozoi, viene rilasciata qualche secondo dopo; ha aspetto lattiginoso ed è composta dai secreti dell'epididimo, dell'ampolla ed è particolarmente abbondante in Glicerofosforicolina (GPC) e scarsa di acido citrico e gel. La terza frazione proveniente dall'uretra, contiene pochi spermatozoi, ma una gran quantità di acido citrico e di gel che servono a lavar via i pochi spermatozoi rimasti nel condotto. Il contributo a quest'ultima frazione è dato in misura maggiore dalle vescichette seminali. Il secreto della ghiandola vescicolare è gelatinoso, bianco o giallastro ed è ricco in fruttosio, che costituisce la principale fonte energetica per gli spermatozoi. A seconda della stagione e dello stallone, il secreto può contribuire o meno alla porzione maggiore del plasma seminale nell'eiaculato, con un incremento da Aprile a Luglio. Questa variazione stagionale nella secrezione di gel da parte di questa ghiandola, può riflettere le differenti concentrazioni ematiche di testosterone.

La vagina artificiale

La vagina artificiale (AV) è lo strumento più comunemente utilizzato per la raccolta dello sperma da stalloni impiegati nei programmi di fecondazione artificiale, per seme fresco o da congelare, o per spermioigrammi. Ci sono diversi tipi di vagina artificiale disponibili in commercio e, anche se con molteplici differenze, tutti i modelli seguono lo stesso formato di progettazione: si tratta di una doppia camera in lattice, di forma tubulare che viene riempita d'acqua calda (a 42 °C circa), il tutto contenuto in una struttura rigida esterna che può essere di cuoio o plastica. Di solito viene agganciato un contenitore alla parte finale della vagina e la sua funzione è proprio quella di contenere lo sperma eiaculato. In questo dispositivo viene quasi sempre messo un filtro di cellulosa per rimuovere la frazione di gel liquido seminale ed eventuali detriti, quali primo fra tutti lo smegma prepuziale. I due modelli attualmente più in uso sono il Colorado e il Missouri. Il modello Colorado è stato modificato da diverse industrie, ma mantiene un identico progetto di base. Questi di seguito sono alcuni vantaggi comuni osservati in questi modelli:

COLORADO

- La temperatura dell'acqua è mantenuta più a lungo durante la stagione fredda.
- È più resistente in condizioni di utilizzo estreme.
- All'ora di sostituire alcuni pezzi

MISSOURI

- È più conveniente come primo acquisto.
- È più leggera e quindi più facile da gestire quando si riempie di acqua calda.
- Consente l'aggiunta di aria per

per usura o perché danneggiati, questi sono più economicamente convenienti.

- Se non troppo lunga, consente allo stallone di eiaculare perfettamente lungo la zona riscaldata, evitando così il pericolo di danni allo sperma da shock termico.

ottenere una pressione ottimale.

- Consente una stimolazione manuale del pene meno diretta, che può essere preferibile con alcuni stalloni.



Figura 1 Vagina artificiale modello Colorado.



Figura 2 Vagina artificiale modello Missouri.

Ogni modello di AV ha diversi vantaggi e svantaggi rispetto ad un altro; molti operatori ma anche gli stalloni stessi, preferiscono un determinato modello rispetto ad un altro. Molte aziende e centri di raccolta dello sperma utilizzano un rivestimento sterile interno nella vagina artificiale. Questo involucro è generalmente costituito da una plastica sottile di qualsiasi tipo, ed è particolarmente utile se si raccoglie lo sperma da stalloni differenti, in quanto elimina abbastanza bene ogni possibilità di contaminazione crociata, sia batterica che seminale. Inoltre è estremamente conveniente utilizzarlo anche se non si deve prelevare il seme a più stalloni, in quanto rimuovendolo dopo il prelievo, elimina la necessità di pulire la superficie interna di lattice dopo ogni uso e quindi permette in parte di risparmiare tempo; questo contribuirà inoltre ad aumentare la vita stessa della camera di lattice, ritardando quindi la sua usura. Spesso alcuni stalloni non tollerano la guaina usa e getta, ma cambiando la temperatura interna o la pressione della AV, o il passaggio ad un'altra marca o tipo di modello, diverso in spessore o "morbidezza", si può risolvere il problema. Alcuni involucri sterili disponibili in commercio, in particolare quelli progettati per l'utilizzo nel modello di AV Missouri, sono già dotati del filtro per il gel e detriti, che può risultare molto conveniente. E' necessario determinare quali siano le preferenze dello stallone per quanto riguarda la pressione, temperatura, tipo di AV, il tipo di camera di lattice, lubrificante, ecc. Spesso è necessario fare diverse prove per ottenere i parametri ottimali della AV che più soddisfano lo stallone.

Prelievo di seme

L'abilità di trattare con uno stallone per riuscire ad ottenere la massima risposta sessuale con la minima difficoltà in termini di seme è un'arte. In generale, esistono alcune regole di base per il prelievo del seme, ma ciascun operatore è differente, così come lo è lo stallone. Alcuni stalloni rispondono molto bene ai comandi vocali e hanno bisogno solamente di un contenimento minimo per essere completamente sotto controllo. Con altri invece si deve ricorrere a mezzi di contenzione o a imboccature severe aiutandosi inoltre con barriere fisiche di contenzione. E' consigliabile che lo stallone possa avvicinare la fattrice in maniera sicura e che apposite barriere lo dividano da questa, al fine di evitare spiacevoli incidenti.

Lavaggio del pene

Prima di ogni operazione di prelievo di seme, il passo essenziale da compiersi è quello del lavaggio del pene dello stallone. Negli ultimi anni ci sono state opinioni discordanti circa l'utilizzo o meno di saponi o disinfettanti per la pulizia del pene: quello che comunque si continua a consigliare è un lavaggio con sola acqua tiepida (circa 42°C). Si pensa che l'utilizzo dei vari detergenti di disinfezione possa provocare un'alterazione della normale flora batterica delle vie urinarie inferiori potendo inoltre causare una crescita selettiva di determinati ceppi patogeni e dare non pochi problemi nei successi prelievi. Durante il lavaggio si devono osservare scrupolosamente tutte le strutture anatomiche del pene per controllare che non ci siano lesioni, se l'orifizio uretrale è infiammato o la presenza di strani fluidi o concrezioni. Il tutto deve essere effettuato utilizzando guanti in lattice monouso per non contaminare o lesionare l'apparato genitale. Il pene eretto dello stallone deve essere deflesso e non stretto

dall'operatore. L'asciugatura non è necessaria però se eseguita è sufficiente effettuarla con un po' di carta. Si consiglia in questa fase di dare dei leggeri colpi al glande per stimolare l'inizio dell'eiaculazione.



Figura 3 Lavaggio del pene dello stallone.

Prelievo di seme

I due modi più comunemente utilizzati per il prelievo del materiale seminale sono il manichino (phantom) o una cavalla su cui lo stallone possa montare. Mentre si lava il pene dello stallone, la cavalla viene posizionata e legata con gli arti imbalzati perché non si muova per ovvie ragioni di sicurezza e immobilizzata ulteriormente con il torcinaso sempre nel caso che non si utilizzi il manichino. È opportuno che la cavalla sia ben detersa nella zona perineale, la coda ritratta e

possibilmente protetta da un guanto da esplorazione rettale e preferibilmente in un buono stato di calore.



Figura 4 Posizionamento e contenzione delle cavalla.

Il tecnico che esegue il prelievo deve regolare la pressione interna della vagina artificiale a seconda dello stallone. La cavalla deve stazionare in una superficie dove abbia un buon piano d'appoggio su tutti e quattro gli arti. Estrema attenzione deve essere osservata affinché siano create le condizioni ideali per la monta. L'operatore si deve posizionare nello stesso lato in cui si trova l'artiere che tiene lo stallone, leggermente arretrato. Colui che preleva deve coordinare tutto il processo impartendo i comandi a coloro che tengono la cavalla e lo stallone. Lo stallone può avvicinarsi immediatamente alla cavalla e montarla se ha un'erezione derivata da un'elevata libido. L'artiere deve accertarsi che ci sia un

buon lasco di corda quando il cavallo monta. Il tecnico che preleva a questo punto avanza, deflette il pene dello stallone dentro la AV, che deve essere collocata con un angolo favorevole al cavallo. A questo punto si deve cercare di muovere la AV in maniera che dia il massimo stimolo sessuale allo stallone e che rispetti l'angolo reale di una eventuale vagina di una eventuale cavalla. L'operatore può sostenere la AV con la mano sinistra e con la destra il fondo della stessa. Per sopperire al peso della AV si può spingere la stessa contro la cavalla, ma spingerla verso l'addome dello stallone sembra essere più stimolante per quest'ultimo.



Figura 5 Corretta inclinazione della vagina per ottenere la massima risposta sessuale.

Quando lo stallone inizia ad eiaculare, l'operatore può osservare i getti di seme (le pulsazioni) che attraversano l'uretra fino a raggiungere il fondo della AV. Le pulsazioni sono frequentemente associate con un movimento di pompa della coda che viene chiamato flagging. Dopo le prime due o tre pulsazioni la parte anteriore della AV può essere gradualmente sfilata dal pene e inclinata verso il basso fino ad estrarla completamente dal pene dello stallone.



Figura 6 Eiaculato appena raccolto.

Motilità del seme

Il movimento dello spermatozoo inizia a livello del collo e poi si propaga al flagello, che s'incurva e lo rende progressivamente motile. (Amann e Graham, 1993). La motilità del seme può essere misurata tramite valutazione visiva o per mezzo degli analizzatori automatici d'immagine. Con la valutazione visiva si stima la percentuale di spermatozoi motili utilizzando la microscopia in contrasto di fase (a 100 X o 200 X) con il campione mantenuto a temperatura costante di 37 °C. La valutazione è comunque soggettiva e legata alla capacità del singolo operatore. Per ottenere misure oggettive è necessario utilizzare gli analizzatori automatici d'immagine (sistemi CASA Computer-assisted sperm analysis) che prevedono l'acquisizione di immagini tramite generatori di segnali analogici (telecamera o videoregistratori) convertiti in segnali digitali da un apposito convertitore (ADC). Ogni campo microscopico viene digitalizzato varie volte in successione (da 15 a 60 fotogrammi), consentendo di ottenere una serie di immagini digitalizzate. Ognuna di queste rappresenta una matrice di valori numerici (praticamente una tabella con tante righe e colonne quanti sono i punti di definizione dello schermo), ai quali viene associato un livello di grigio (quelli ad 8 bits consentono di ottenere 256 livelli di grigio: 0=nero, 255=bianco). In questa fase è molto importante il valore minimo e massimo di superficie che la testa di uno spermatozoo può occupare: l'insieme di punti di simile tonalità di grigio (al valore definito dall'operatore al momento dell'analisi o selezionato in automatico dallo strumento) che occupa una superficie compresa nel range predefinito viene identificato come spermatozoo. Questo calcolo viene compiuto su ognuna delle immagini digitalizzate che compongono la serie, rendendo possibile la ricostruzione del movimento di ogni singola cellula ed il calcolo di

alcune variabili associabili al carattere cinetica. Oltre la motilità assoluta dello sperma questi sono gli altri parametri analizzati dal CASA:

Motilità progressiva: uno spermatozoo è progressivamente motile quando possiede LIN (linearity = linearità) o STR (straightness = rettilineità) maggiore di 1, cioè è uno spermatozoo che si sposta in linea retta. Questa motilità conta solo gli spermatozoi che progrediscono secondo una linea retta ed esclude tutti gli altri che nuotano in maniera circolare.

Velocità curvilinea (VCL; $\mu\text{m}/\text{sec}$): misura la progressione sequenziale dello spermatozoo lungo la sua vera traiettoria;

Velocità lineare (VSL; $\mu\text{m}/\text{sec}$): misura la traiettoria retta dello spermatozoo per unità di tempo;

Velocità VAP (VAP; $\mu\text{m}/\text{sec}$): misura la traiettoria intermedia dello spermatozoo per unità di tempo;

Coefficiente lineare (LIN) (%) = $\text{VSL}/\text{VCL} \times 100$;

Coefficiente di linearità (STR) (%) = $\text{VSL}/\text{VAP} \times 100$;

coefficiente di Wobble (WOB) (%) = $\text{VAP}/\text{VCL} \times 100$;

Lateralizzazione media della testa (μm) che misura la variazione media della posizione della testa lungo la traiettoria curvilinea;

BCF (Hz) è il numero di volte in cui la testa attraversa il traiettoria media/sec.

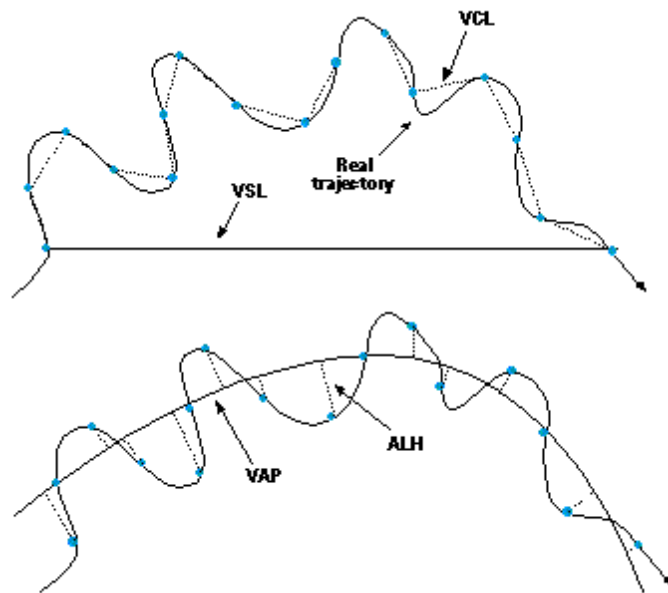


Figura 7 Principali parametri analizzati dal sistema CASA: VCL, VSL e VAP.

Secondo *Pickett* (1993), la motilità progressiva è la caratteristica del seme più correlata con la fertilità. Il tipo di movimento può essere influenzato dalla viscosità, dalla temperatura, dalla profondità e dalla composizione chimica del mezzo in cui gli spermatozoi sono sospesi. Tenendo conto delle dimensioni di uno spermatozoo equino, dell'ampiezza delle flessioni della coda e delle oscillazioni della testa, la profondità minima del preparato atta a garantire libertà di movimento alla cellula spermatica è di 50-100 micrometri. Purtroppo tale profondità renderebbe impossibile l'osservazione di uno spermatozoo in un preparato per microscopio ottico, così, per poter valutare criticamente, bisogna limitare il movimento, nella speranza di non influenzare la validità dell'osservazione. Questa assunzione è da ritenersi valida se la profondità del preparato è maggiore o uguale a 10-12 micrometri. Scendendo sotto i 10 micrometri, lo spermatozoo incontra sempre maggiori impedimenti nel muoversi. Le preparazioni di solito sono profonde 15-30 micrometri quando la dimensione

della goccia tra vetrino e copri-vetrino è adeguata. Per l'osservazione computerizzate, la profondità viene ridotta a 15-20 micrometri.

Gli effetti della temperatura sulla motilità spermatica spesso sono ignorati dai clinici, o per scarsa considerazione o per il costo del mantenimento di un'adeguata temperatura a tutti i livelli. *Amann e Graham* (1993) affermano che la mancanza di una temperatura adeguata durante l'osservazione del seme al microscopio può ripercuotersi in valutazioni scorrette. La temperatura influisce su tutti i parametri della motilità, i 22 °C sono il punto critico, che è essenzialmente la temperatura ambientale media, nella quale la percentuale di spermatozoi motili o progressivamente motili è più bassa rispetto a temperature più alte. Dunque controllare gli spermatozoi a 37°C è essenziale per consentirgli di spostarsi al massimo delle loro potenzialità. Inoltre l'osservazione a questa temperatura, è utile per minimizzare le differenze tra un campione e l'altro.

La motilità di sicuro è un prerequisito importante per una normale penetrazione attraverso la zona pellucida e per l'adesione alla membrana plasmatica dell'oocita. (*Amann e Graham*, 1993).



Figura 8 Sistema CASA utilizzato nel laboratorio di spermologia equina dell'Ospedale clinico veterinario di Caceres.

Citofluorimetria a flusso

La citofluorimetria (o citometria) a flusso è una tecnica che misura simultaneamente e poi analizza più caratteristiche fisiche di singole particelle, di solito le cellule, mentre queste sono caricate in un flusso fluido e fatte attraversare da un fascio di luce. Le proprietà misurate comprendono: le dimensioni relative della particella, la granularità apparente o complessità interna e l'intensità di fluorescenza relativa. Queste caratteristiche sono determinate con un sistema di accoppiamento ottico ed elettronico che registra come la cellula o la particella disperda la luce incidente generata da un laser ed emetta fluorescenza. Il citofluorimetro a flusso è costituito da tre sistemi principali: il sistema fluidico, quello ottico e l'elettronico.

- Il sistema fluidico trasporta le particelle in un flusso verso il fascio laser dove saranno singolarmente interrogate;
- il sistema ottico è composto dal laser che illumina le particelle del flusso campione e da filtri ottici che dirigono i segnali di luce emessa dalle cellule verso i rilevatori del caso;
- il sistema elettronico converte i segnali luminosi rilevati in segnali elettrici che possono essere elaborati dal computer. Per alcuni strumenti dotati della possibilità di poter separare le particelle analizzate (sorters), il sistema elettronico è anche in grado di avviare questa separazione caricando elettricamente le particelle e deviandole verso due poli distinti.

Nel citofluorimetro, le particelle sono portate all'intersezione con il raggio laser in un flusso liquido. Qualunque sospensione di particelle o cellule da 0,2 ai 150 μm di diametro è adatta a questo tipo di analisi. Cellule provenienti da tessuti

duri devono essere disgregate prima dell'analisi. La corrente di fluido in cui si trovano le particelle è chiamata nucleo del campione. Quando le particelle intersecano il fascio laser, disperdono una quantità di luce, dopo essere state eccitate da quella proveniente dal laser. Eventuali molecole fluorescenti presenti nelle particelle emettono la loro fluorescenza caratteristica. La luce diffusa e le eventuali fluorescenze vengono raccolte e deviate in modo appropriato da specifiche lenti. Una combinazione di divisori di fascio e filtri, dirige la luce dispersa e la luce fluorescente agli opportuni rilevatori. I rivelatori producono segnali elettrici proporzionali all'intensità dei segnali ottici ricevuti. I parametri di ogni particella (definita come evento) sono poi salvati in un apposita lista di dati. Le caratteristiche o parametri di ogni evento sono basati sulla diffrazione della luce e sulle sue proprietà di fluorescenza. I dati vengono raccolti e memorizzati nel computer. Questi dati possono essere analizzati e rappresentati graficamente per fornire informazioni sulle sottopopolazioni presenti all'interno del campione (Givan, 1992). La citometria a flusso consente quindi l'osservazione delle caratteristiche fisiche degli spermatozoi: le loro dimensioni, la loro forma e la loro complessità interna e l'attività di qualsiasi componente o funzione dello spermatozoo che può essere rilevata da un fluorocromo o con composti coniugati con fluorocromi. L'analisi con la citofluorimetria è obiettiva perché ha un elevato livello di ripetibilità sperimentale e ha il vantaggio di essere in grado di lavorare con campioni di piccole dimensioni. Ha anche la capacità di identificare la presenza di diversi fluorocromi associati agli spermatozoi, il che significa che possono essere valutati simultaneamente più attributi di un singolo spermatozoo. Questa caratteristica è la massima innovazione del citometro. Inoltre tutto questo ha un ulteriore vantaggio per l'analisi del seme: è stato studiato che i parametri dello sperma nel range di normalità presi singolarmente non hanno correlazioni significative con la fertilità in vivo (Larsson et al, 2000)

invece grazie alla possibilità di poterli testare contemporaneamente con la citometria, la previsione della fertilità diventa più accurata (*Amman, Hammerstedt, 1993*).

Un ulteriore vantaggio della citometria a flusso è la possibilità di valutare un gran numero di spermatozoi in un periodo di tempo molto breve, in genere ad una velocità di 8000-20.000 spermatozoi/s. Generalmente si analizza un totale di 10.000 spermatozoi, che è un numero nettamente maggiore al numero di cellule osservate con l'analisi microscopica che in genere si attesta su un totale di 200 unità. Questo rende la citometria a flusso un metodo molto sensibile per la rilevazione delle sottili differenze tra gli spermatozoi che non possono essere evidenziate con le altre tecniche d'analisi. Nonostante i numerosi vantaggi derivati dall'utilizzo di questa tecnica per le analisi routinarie dello sperma, il suo uso è spesso limitato solamente alla ricerca per il suo costo e per le difficoltà di funzionamento associate all'esigenza di avere nel laboratorio un operatore qualificato in grado di effettuare le analisi e che conosca bene la macchina. In aggiunta, un citofluorimetro ha delle dimensioni abbastanza grandi e non è molto resistente ad urti e sollecitazioni meccaniche, il che significa che richiede una posizione fissa nel laboratorio. Tuttavia, il recente sviluppo di citometri dal costo ragionevole ha aumentato la domanda di questo tipo di analisi.

La citofluorimetria a flusso richiede che gli spermatozoi siano trasportati singolarmente in una sospensione cellulare con la minima percentuale di agglutinazione (sospensione monodispersa). Gli spermatozoi che sono stati coniugati con un fluorocromo specifico possono essere analizzati sia vivi che fissati. La scelta del fluorocromo è influenzata sia dal tipo di studio che dalle lunghezze d'onda di eccitazione proprie di ogni laser montato nel citofluorimetro. Dopo essere stati incubati con il fluorocromo, gli spermatozoi vengono aspirati e fatti rapidamente passare nella cella di flusso, dove vengono illuminati da una

luce che, nella maggior parte dei citometri a flusso moderni è un laser, che emette luce ad una lunghezza d'onda specifica. Ci sono diversi tipi di laser disponibili in commercio, che si differenziano per il mezzo che viene utilizzato per amplificare la luce, come il gas, per esempio, argon, elio-neon ed elio-cadmio. Quando gli spermatozoi sono interrogati dal fascio laser, la luce emessa per dispersione viene raccolta da due lenti, una si trova di fronte al laser e l'altra alla destra del primo (di solito a 90 ° rispetto alla prima) e da una serie di lenti ottiche, divisori di fascio e filtri, per la successiva misurazione delle bande specifiche di fluorescenza. Se il campione passa attraverso il flusso prima della raccolta dei dati, gli eventi identificati dal citometro non sono considerati spermatozoi e qualsiasi autofluorescenza è sottratta dal totale dell'intensità di fluorescenza misurata.

L'integrità di membrana degli spermatozoi può essere determinata con colorazioni fluorescenti in due differenti modi: il primo con fluorocromi che evidenziano le cellule vitali; il secondo invece con altri che indicano le cellule non vitali. L'uso della citometria a flusso per determinare la percentuale di spermatozoi vitali nel maiale è stata sviluppata da vari laboratori nel 1980. *Resli et al.* (1983) utilizzarono il diacetato di fluoresceina (FDA), altri hanno utilizzato il 6-diacetato carbossifluoresceina (CFDA) o successivamente la 6-carbossimetilfluoresceina diacetato (CMFDA) (*Garner et al.* 1986) e estere aceto metil esterasi (CAM) (*Donoghue et al.* 1995), che tende ad essere più stabile rispetto all'originale FDA. FDA, CFDA, CMFDA e CAM entrano negli spermatozoi attraverso la membrana plasmatica e sono convertiti dalle esterasi degli spermatozoi vitali in un composto fluorescente, che si mantiene nel citoplasma. Recentemente, si è diffuso l'utilizzo di fluorocromi permeabili alla membrana che si legano al DNA, come il SYBR-14, che si fissa alle cellule entrando con le pompe ioniche funzionali (*Garner et al.* 1996). Cellule non vitali

possono essere determinate con un fluorocromo impermeabile alla membrana che si lega all'acido nucleico, cosicché evidenzia solo le cellule con la membrana danneggiata penetrando in esse. Una cellula con la membrana plasmatica intatta impedisce l'entrata del prodotto e la conseguente colorazione del nucleo. Esempi frequenti sono le feniline, per esempio lo ioduro di propidio (PI) (*Matyus et al.* 1984) etidio omodimero-1 (EthD-1), la cianina Yo-Pro (*Kavak et al.* 2003) e il bizbenzimidazolo Hoechst 33258 (*Gundersen, Shapiro, 1984*). *Wilhelm et al.* (1996) concentrando i loro studi sulla fertilità del seme crioconservato di stallone, dopo una serie di analisi di laboratorio sulla qualità dello sperma hanno scoperto che l'integrità di membrana, valutata mediante citofluorimetria a flusso utilizzando PI, è stato l'unico test di laboratorio che ha evidenziato una buona correlazione con la fertilità ($r = 0,68$). Sonde fluorescenti come H33258, che richiedono analisi di citofluorimetria a flusso con un laser che opera nella gamma di luce ultravioletta, sono meno usate, di conseguenza, questa non rientra nelle funzioni standard dei citometri più semplici. Fluorocromi utilizzati per valutare la vitalità degli spermatozoi con entrambi gli approcci possono essere utilizzati uno in combinazione con l'altro. Ad esempio, quando CFDA è usato insieme a PI, possono essere identificate tre popolazioni di cellule: le vive, che emettono fluorescenza verde; quelle morte, che si colorano di rosso e una terza popolazione che si colora con entrambi e rappresenta la sottopopolazione degli spermatozoi che stanno morendo. *Almid e Johnson* (1988) hanno trovato questa combinazione utile per il monitoraggio del danno alla membrana nel seme congelato/scongelato di maiale durante la valutazione dei vari protocolli di congelamento. Anche *Harrison e Vickers* (1990) hanno usato nei loro studi questa combinazione con la microscopia a fluorescenza e affermano essere una tecnica efficace nell'integrità di membrana del seme fresco, incubato o dopo shock a bassa temperatura di verro e ariete. *Garner et al.* (1986) usarono questa

combinazione per testare spermatozoi di molte specie ma in quel periodo non fu trovata una correlazione tra integrità di membrana dello sperma di toro sondata tramite CFDA/PI e la fertilità. Allo stato attuale, una delle combinazioni più comunemente usata è la SYBR-14 e PI, venduta come LIVE/DEAD® Sperm viability Kit (Molecular Probes Inc., OR, USA). Il target di entrambi i fluorocromi è lo stesso componente cellulare: il nucleo, il che elimina le ambiguità di interpretazione che possono sorgere quando i fluorocromi hanno distinti target. Quando sono utilizzati in combinazione, i nuclei degli spermatozoi vitali si colorano con fluorescenza verde (SYBR-14) e le cellule degenerate che hanno perso la loro integrità di membrana si colorano di rosso (PI). Questa tecnica di colorazione è stata usata in un certo numero di specie, tra cui il verro (*Garner et al.* 1995). La colorazione con fluorocromi per la viabilità può essere utilizzata anche in combinazione con colorazioni per la valutazione di altri componenti della cellula mediante citometria a flusso, come ad esempio l'integrità della membrana acrosomiale o la funzionalità mitocondriale.



Figura 9 Citofluorimetro utilizzato per gli esperimenti.

Nel nostro caso si è utilizzata la colorazione con YO-PRO-1 e omodimero di etidio-1 (Molecular probes Europe). La colorazione con queste due sonde dà la divisione del campione in quattro sottopopolazioni. (Vedi Figura 11). La prima sottopopolazione è rappresentata dagli spermatozoi che non si colorano e non emettono quindi fluorescenza. Questi sono considerati vitali e senza alcun tipo di alterazione della membrana. Un'altra sottopopolazione di cellule spermatiche è quella positiva allo YO-PRO-1 che emette fluorescenza verde. È stato dimostrato che, nelle prime fasi dell'apoptosi, avviene una modificazione della permeabilità di membrana che permette selettivamente l'entrata di alcune molecole impermeabili alla membrana che si legano al DNA (*Ormerod et al.* 1993; *Wronsky et al.* 2002). Questa sottopopolazione di cellule spermatiche mostra un danno primitivo o uno shift delle cellule ad un stadio fisiologico più avanzato

verso l'apoptosi, visto che la membrana diviene leggermente più permeabile durante le prime fasi del danno da congelazione, permettendo allo YO-PRO-1 di entrare ma non all'omodimero di etidio-1. (*Wronsky et al.* 2002, *Idziorek et al.* 1995). Infine le due sottopopolazioni in cui riscontriamo la necrosi degli spermatozoi indotta dal danno del congelamento sono facili da individuare: gli spermatozoi recentemente morti legano sia lo YO-PRO-1 sia l'omodimero di etidio-1 (emettendo fluorescenza sia verde che rossa) mentre gli spermatozoi morti già da un po' di tempo legano solamente l'omodimero di etidio-1 emettendo solamente una fluorescenza rossa. A questo punto i fotomoltiplicatori 1 e 3 rilevano le fluorescenze verdi e rosse e la combinazione delle due rappresentando graficamente il risultato.

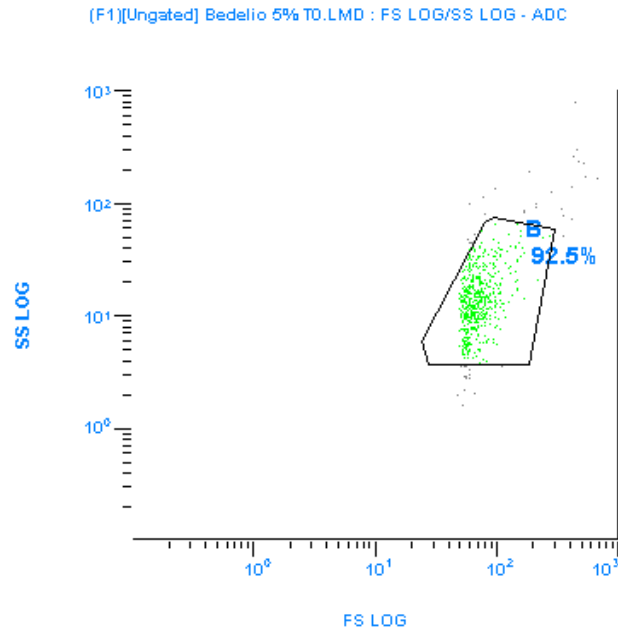


Figura 10 Esempio di citogramma: diagramma bidimensionale ottenuto dalla combinazione del forward (dimensioni) e del side (granulosit ) scatter. Permette di discriminare tra diverse popolazioni cellulari(nel caso specifico spermatozoi di stallone) basandosi solamente sulle loro caratteristiche fisiche.

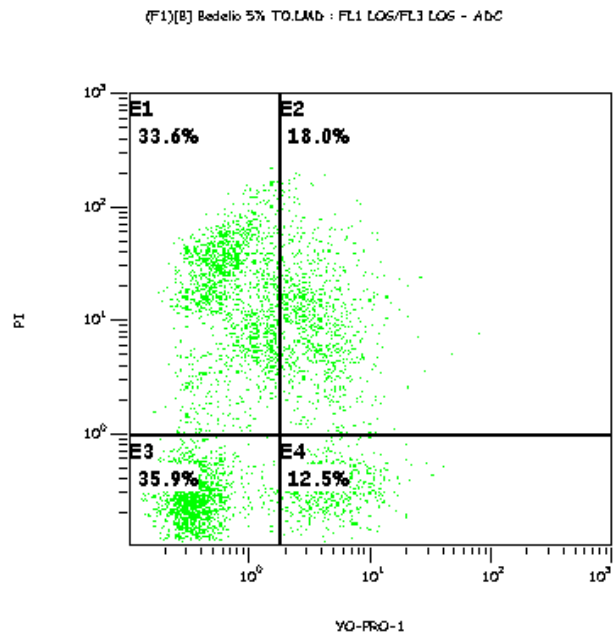


Figura 11 Sottopopolazioni ottenute dopo l'incubazione con Yo-Pro-1 e Omodimero di etidio-1. In basso a sinistra (quadrante E3) la percentuale di spermatozoi vivi, seguendo in senso antiorario quelli con un iniziale alterazione di membrana (E4) fino ai morti nel quadrante E1.

Diluenti

PBS

Il PBS (Phosphate buffered saline = tampone fosfato salino) è una soluzione tampone comunemente usata in molti laboratori biologici. E' una soluzione salina che contiene cloruro di sodio, sodio fosfato e potassio fosfato. Il tampone aiuta a mantenere costante il pH. La concentrazione salina è isotonica a quella dei fluidi animali ed umani. La composizione è la seguente: NaCl alla concentrazione finale di 1.37M, KCl a 27mM, Na₂HPO₄ a 5.62mM, NaH₂PO₄ a 1.09mM, e KH₂PO₄ a 1.47mM. Il pH della soluzione è di 7,4. Solitamente viene usato diluito 10 volte in acqua MilliQ e sterilizzato per filtrazione o in autoclave.

INRA 96

L'INRA 96 è un prodotto commerciale a base di latte scremato sterile, in particolare contiene la frazione purificata delle proteine micellari, zuccheri quali glucosio, lattosio e raffinoso, e altri componenti quali sodio citrato diidrato e citrato di potassio. Infine il prodotto contiene anche due antibiotici (Penicillina e Gentamicina) e un antifungino (Anfotericina B) per ridurre al massimo lo sviluppo microbico e fungino durante la conservazione del seme. Questo extender ha un pH di $7,10 \pm 0,10$; con una osmolalità tra i 330 e 360 mOsm/Kg.

GHENT

Il Ghent (Minitüb Ibérica, Spagna) è un medio crioprotettivo aggiunto al seme durante il congelamento al fine di ridurre il più possibile i danni provocati dallo shock termico. È una soluzione contenente glicerolo, tuorlo d'uovo e gentamicina in concentrazioni non conosciute per volere della casa produttrice.

Scopo

Lo scopo di questo lavoro è stato verificare l'effetto dell'aggiunta post-scongelo di plasma seminale, proveniente da soggetti con diverse attitudini alla produzione di seme congelato, ad un pool eterospermico di seme equino.

La raccolta dei dati e le analisi sono state eseguite presso l'Ospedale Clinico Veterinario dell'Università di Extremadura, Cáceres, Spagna e il relativo laboratorio di spermologia.

Materiali e metodi

Vengono descritti in questo capitolo i settaggi degli strumenti utilizzati nell'analisi dei campioni, con particolare riferimento al prelievo di seme, al sistema CASA, alla citofluorimetria di flusso e al congelamento/scongelo del seme e viene descritto accuratamente il protocollo sperimentale utilizzato nel nostro lavoro.

Analisi della motilità spermatica

I parametri cinetici dello sperma sono stati analizzati nel seme dopo lo scongelamento usando il sistema CASA (ISAS Proiser, Valencia, Spagna). Le analisi erano basate sull'esame di 25 immagini digitali consecutive, ottenute da un singolo campo utilizzando un obiettivo 10 X di un microscopio a contrasto di fase negativo e un piano riscaldato (37 °C). Lo sperma è stato caricato in una camera Leja (Leja, Amsterdam, Olanda) di 20 µm di profondità. Le immagini sono state prese con un intervallo di tempo di 1 sec. con una velocità di acquisizione di 1 immagine ogni 40 msec. Il numero di oggetti non correttamente identificati come spermatozoi è stato minimizzato sul monitor utilizzando la funzione di riproduzione (playback function). Per quanto riguarda l'impostazione dei parametri per il programma, gli spermatozoi con una VAP < 10 µm/s sono stati considerati non motili, mentre gli spermatozoi con una velocità > 15µm/s sono stati considerati motili. Spermatozoi che deviavano meno del 45% rispetto ad una linea retta, sono stati considerati linearmente motili.

Citofluorimetria a flusso

Le analisi di citometria a flusso sono state effettuate con un citofluorimetro Coulter EPICS XL (Coulter Corporation Inc., Miami, FL). Questo è dotato di un ottica standard, un laser a ioni di argon (Cyonics, Coherent, Santa Clara, CA) che lavora a 15 mW a 488 nm, e che utilizza come software l'EXPO 2000. Le sottopopolazioni sono state divise in quadranti, e la frequenza di ciascuna delle sottopopolazioni è stata quantificata. Eventi classificati come non-spermatozoi (residui) sono stati esclusi basandosi su un disegno di dispersione in avanti e di diffusione di lato di una regione che racchiude la popolazione di cellule di interesse. Eventi con dispersioni simili alle cellule dello sperma, ma non contenenti DNA sono state ragionevolmente escluse. La forward-scattered light (FSC) e la side-scattered light (SSC) sono state registrate per un totale di 10.000 eventi per ogni campione (YOPRO -1/OMODIMERO DI ETIDIO-1). I campioni sono stati misurati con un flusso di 200-300 cellule/sec. È stata rilevata una fluorescenza verde nel fotomoltiplicatore (FL)1, mentre una fluorescenza rossa è stata rilevata nel fotomoltiplicatore (FL)3.

Yo-Pro-1 e Omodimero di etidio-1

Entrambe le soluzioni sono state preparate in dimetilsolfossido (DMSO) e sono le seguenti: YO-PRO-1 (25 μ M), e etidio monodimero-1 (1.167 mM). Entrambe si legano al DNA della cellula spermatica, sono impermeabili alla membrana cellulare perciò raggiungono il materiale genetico solamente quando l'integrità della membrana plasmatica è alterata.

Congelamento del seme

Si descrive in questo capitolo il protocollo di congelamento seguito nel laboratorio di spermologia equina del dipartimento di Ostetricia e Riproduzione, facoltà di Medicina Veterinaria di Cáceres, Università dell'Extremadura, Spagna. Il seme, appena raccolto con la vagina artificiale modello Missouri, contenente un filtro interno per la separazione della frazione gelatinosa, viene immediatamente trasportato al laboratorio per la valutazione e la preparazione. L'eiaculato filtrato viene diluito in rapporto 1:1 (v/v) con l'extender INRA 96 (IMV, L'Aigle, France) e centrifugato a 1200 X g per 10 minuti per separare il plasma seminale dalla parte cellulare e successivamente eliminarlo. Si elimina il plasma surnatante con una pipetta mentre il pellet derivato dalla centrifugazione viene diluito nuovamente con un medium crioprotettivo (soluzione da congelamento contenente glicerolo, tuorlo d'uovo e Gentamicina; Ghent, Minitüb Ibérica, Spagna) a una concentrazione finale di 100×10^6 spermatozoi/ml. Successivamente gli spermatozoi sono portati alla temperatura di 4 °C in circa un ora, poi vengono caricati in paillettes di plastica da 0,5 ml, e quindi collocati orizzontalmente in una griglia posizionata 4 cm sopra la superficie dell'azoto liquido per 10 minuti e successivamente immersi completamente nello stesso azoto liquido, in appositi canister di sicurezza. A questo punto il procedimento di congelamento è concluso e le paillettes sono costantemente mantenute alla temperatura di -196°C. E' molto importante controllare che il livello di azoto liquido sia sempre quello ottimale all'interno della cisterna e che nessuna paillette emerga dall'azoto liquido. Nel momento in cui si necessita del seme per gli esperimenti si possono scongelare le paillettes con un semplice procedimento descritto in seguito.

Scongelamento del seme

Il processo di scongelamento del seme è una operazione di estrema facilità e velocità che richiede solamente pochi minuti per essere completata. Le paillettes vengono tolte dai canister immersi nell'azoto liquido e messe direttamente in un bagno di acqua a 37°C per 30 secondi. A questo punto il seme è già pronto per gli esperimenti e non necessita di ulteriori trattamenti. È possibile correggere la concentrazione di spermatozoi diluendo la soluzione con l'extender INRA 96.

Protocollo sperimentale

L'esperimento prevede la preparazione di un pool di seme omogeneo, per questo si sono scongelate sei paillettes di seme di sei differenti cavalli in maniera da ridurre il più possibile la variabilità fra i vari stalloni. Ogni paillette contiene 0,5 ml di seme alla concentrazione totale di 100×10^6 di spermatozoi/ml (quindi 50×10^6 di spermatozoi per ogni paillette). Si ottiene quindi un campione da 3 ml di seme che viene diluito in rapporto 1:1 con l'extender INRA 96 già utilizzato nelle fasi di congelamento, per avere un campione da 6 ml di seme detto campione MADRE. Dal campione MADRE si prendono diverse aliquote di seme con altrettante aliquote differenti di plasma seminale ma in ogni tubo si avrà sempre la quantità totale di 300 μ l di soluzione. Con una micro-pipetta si prelevano dal campione MADRE un campione CONTROLLO di 300 μ l senza plasma seminale, successivamente 285 μ l di seme e 15 μ l di plasma seminale dello stallone BEDELIO, un cavallo "buon congelatore" quindi con il plasma seminale ad una concentrazione del 5% (BEDELIO 5%); 270 μ l di seme con 30 μ l di plasma seminale sempre di BEDELIO quindi alla concentrazione del 10% (BEDELIO 10%); 285 μ l di seme e 15 μ l di plasma seminale di RANCHERO, cavallo valutato come "cattivo congelatore", con una concentrazione del 5% del plasma seminale (RANCHERO 5%) e infine 270 μ l di seme con 30 μ l dello stesso plasma seminale alla concentrazione del 10 % (RANCHERO 10%). Tutti questi campioni vengono etichettati come tempo 0 (T0), le medesime aliquote vengono prese nuovamente una seconda volta per essere incubate in una stufa a 37 °C al buio per 1 ora e successivamente processate come serie al tempo 60 (T60). A questo punto si è misurata la motilità di tutti i campioni al tempo 0 (T0), prelevando 3 μ l, e analizzandoli nell'apposita camera Leja con il sistema

CASA. Tutto ciò è stato ripetuto dopo un'ora al tempo 60 (T60). Contemporaneamente si sono incubati i campioni della serie T0 con le due sonde per la citofluorimetria: YO-PRO-1 e OMODIMERO DI ETIDIO-1 secondo il protocollo di seguito indicato. Si sono incubati, a 37 °C in stufa al buio, la serie dei vari tubi con differenti concentrazioni di plasma seminale (100µl per ogni tubo), con un 1 ml di PBS, 3 µl di YO-PRO-1 e 1 µl di omodimero di etidio-1. Dopo i 16 minuti di incubazione, i campioni sono stati analizzati con il citofluorimetro per misurare l'integrità della membrana plasmatica e quindi determinare la percentuale di spermatozoi vivi. A questo punto, allo scadere dell'ora si è ripetuto lo stesso procedimento per i campioni della serie tempo 60 (T60) unitamente alla misurazione della motilità con il sistema CASA. L'intero protocollo sperimentale è stato ripetuto per 5 volte in cinque differenti giorni.

Analisi statistiche

Di tutti i parametri oggetto di indagine è stata calcolata la media aritmetica ottenuta nei 5 esperimenti. Su questi dati è stata eseguita una ANOVA a due vie usando il tempo (2 livelli: T0-T60) ed il tipo di campione (5 livelli: BEDELIO 5%, BEDELIO 10%, RANCHERO 5%, RANCHERO 10%, CONTROL) come criteri di classificazione. A questo si è fatta seguire una analisi post hoc.

La normalità dei dati è stata preliminarmente verificata tramite il test di Kolmogorov-Smirnov.

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il programma SPSS versione 15.0 per Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

Il valore di α è stato fissato a 0,05.

Risultati

Vengono di seguito riportati i dati delle medie di ogni parametro mediante istogrammi a colonna, ottenute dai cinque esperimenti di analisi del seme con l'aggiunta di plasma seminale.

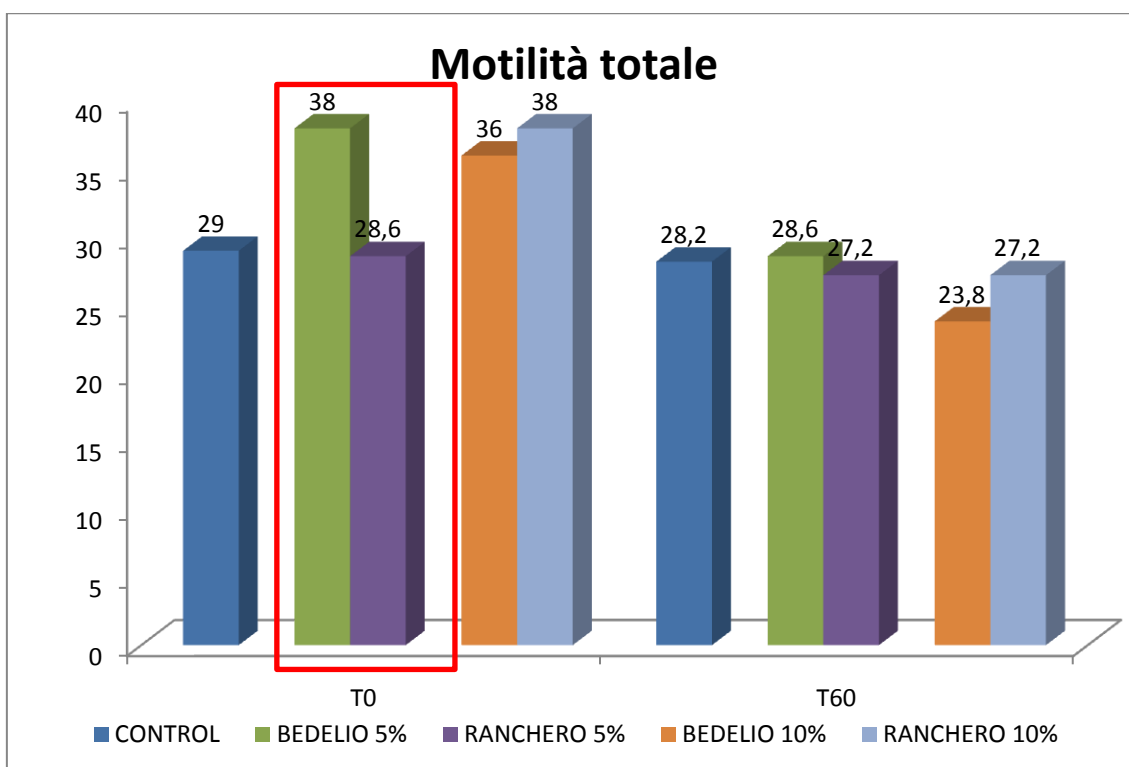


Grafico 1 Confronto fra la motilità totale dei campioni BEDELIO e RANCHERO al 5% e al 10%, prima al tempo 0 (T0) e poi al tempo 60 (T60). Nel riquadro rosso sono evidenziati i 2 unici campioni con una differenza significativa ($\alpha \leq 0,05$).

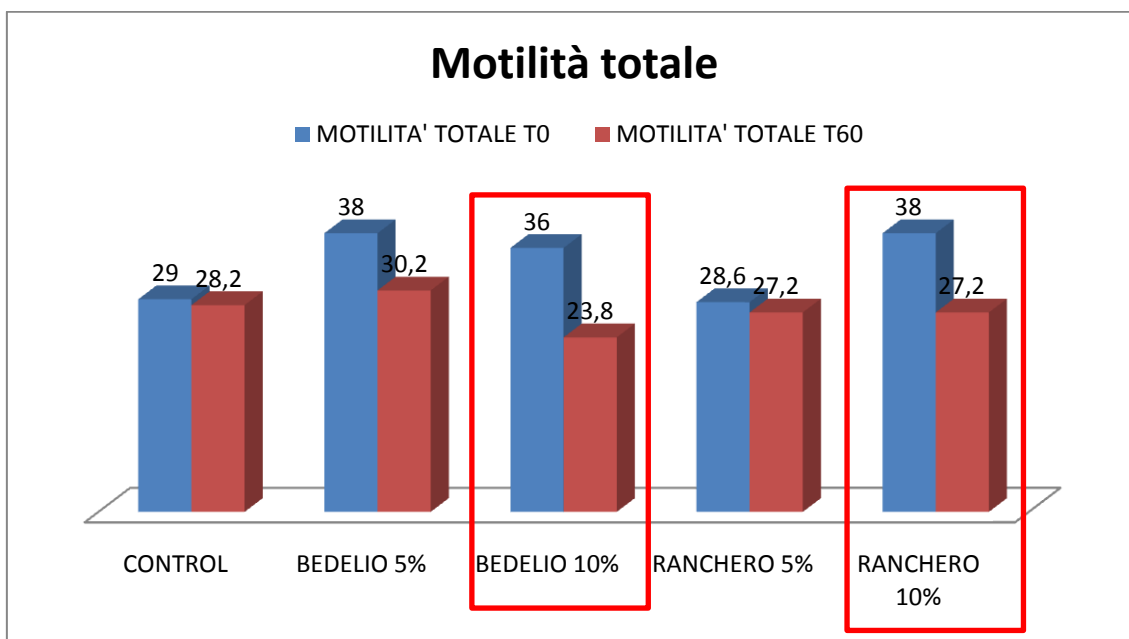


Grafico 2 Istogramma dei valori medi della motilità totale al tempo 0 (T0) in blu e al tempo 60 (T60) in rosso. Nei riquadri rossi sono evidenziati i campioni con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

MOTILITA' TOTALE				
Campione	Tempo 0	Errore standard	Tempo 60	Errore standard
CONTROL	29	3,391164992	28,2	3,527038418
BEDELIO 5%	38	2,828427125	30,2	3,39705755
BEDELIO 10%	36	6,180614856	23,8	1,462873884
RANCHERO 5%	28,6	3,32565783	27,2	4,565084884
RANCHERO 10%	38	5,458937626	27,2	2,374868417

Tabella 1 Valori medi di motilità totale al tempo 0 (T0) e al tempo 60 (T60) con i relativi errori standard. In rosso i valori con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

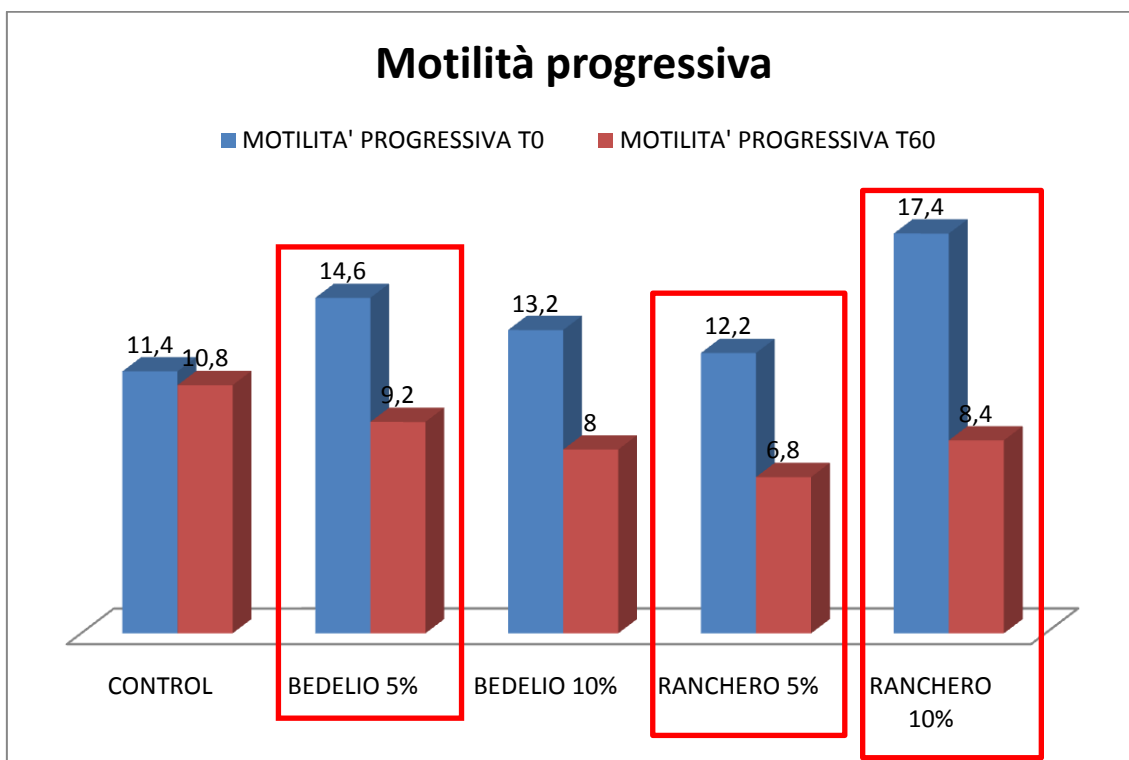


Grafico 3 Istogramma dei valori medi della motilità progressiva al tempo 0 (T0) in blu e al tempo 60 (T60) in rosso. Nei riquadri rossi sono evidenziati i campioni con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

MOTILITA' PROGRESSIVA				
Campione	Tempo 0	Errore standard	Tempo 60	Errore standard
CONTROL	11,4	3,02654919	10,8	2,477902339
BEDELIO 5%	14,6	2,249444376	9,2	1,655294536
BEDELIO 10%	13,2	1,827566688	8	1,870828693
RANCHERO 5%	12,2	2,009975124	6,8	2,26715681
RANCHERO 10%	17,4	3,059411708	8,4	1,989974874

Tabella 2 Valori medi di motilità progressiva al tempo 0 (T0) e al tempo 60 (T60) con i relativi errori standard. In rosso i valori con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

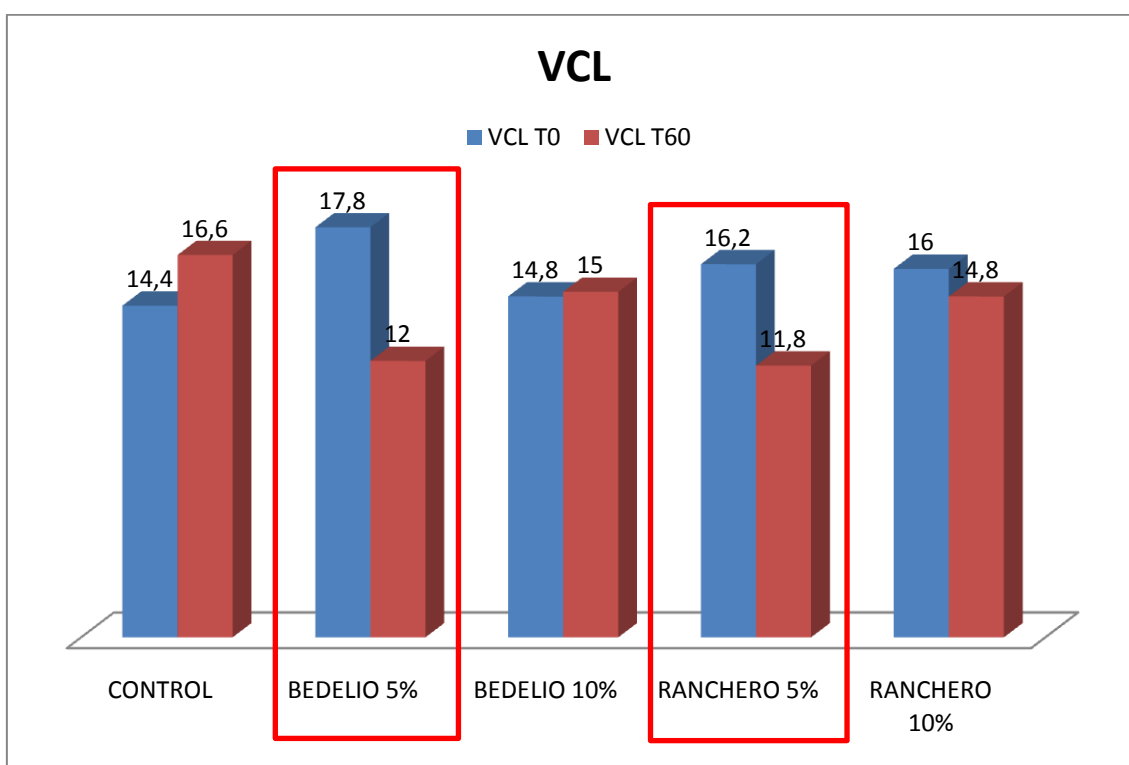


Grafico 4 Istogramma dei valori medi di VCL al tempo 0 (T0) in blu e al tempo 60 (T60) in rosso. Nei riquadri rossi sono evidenziati i campioni con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

VCL				
Campione	Tempo 0	Errore standard	Tempo 60	Errore standard
CONTROL	14,4	1,077032961	16,6	2,712931993
BEDELIO 5%	17,8	1,240967365	12	0,547722558
BEDELIO 10%	14,8	1,933907961	15	2,073644135
RANCHERO 5%	16,2	0,860232527	11,8	1,319090596
RANCHERO 10%	16	0,547722558	14,8	2,576819745

Tabella 3 Valori medi di VCL al tempo 0 (T0) e al tempo 60 (T60) con i relativi errori standard. In rosso i valori con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

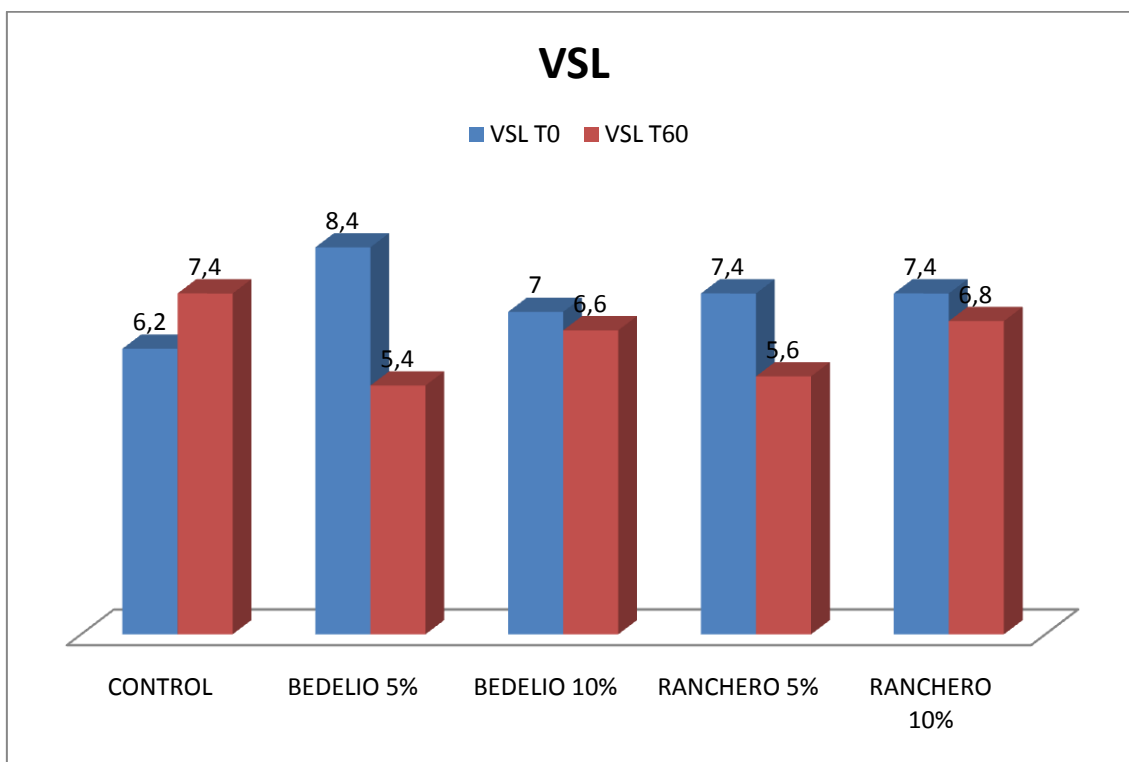


Grafico 5 Istogramma dei valori medi di VSL al tempo 0 (T0) in blu e al tempo 60 (T60) in rosso.

VSL				
Campione	Tempo 0	Errore standard	Tempo 60	Errore standard
CONTROL	6,2	0,8	7,4	1,288409873
BEDELIO 5%	8,4	0,748331477	5,4	0,678232998
BEDELIO 10%	7	1,378404875	6,6	1,435270009
RANCHERO 5%	7,4	0,92736185	5,6	0,92736185
RANCHERO 10%	7,4	0,509901951	6,8	1,280624847

Tabella 4 Valori medi di VSL al tempo 0 (T0) e al tempo 60 (T60) con i relativi errori standard.

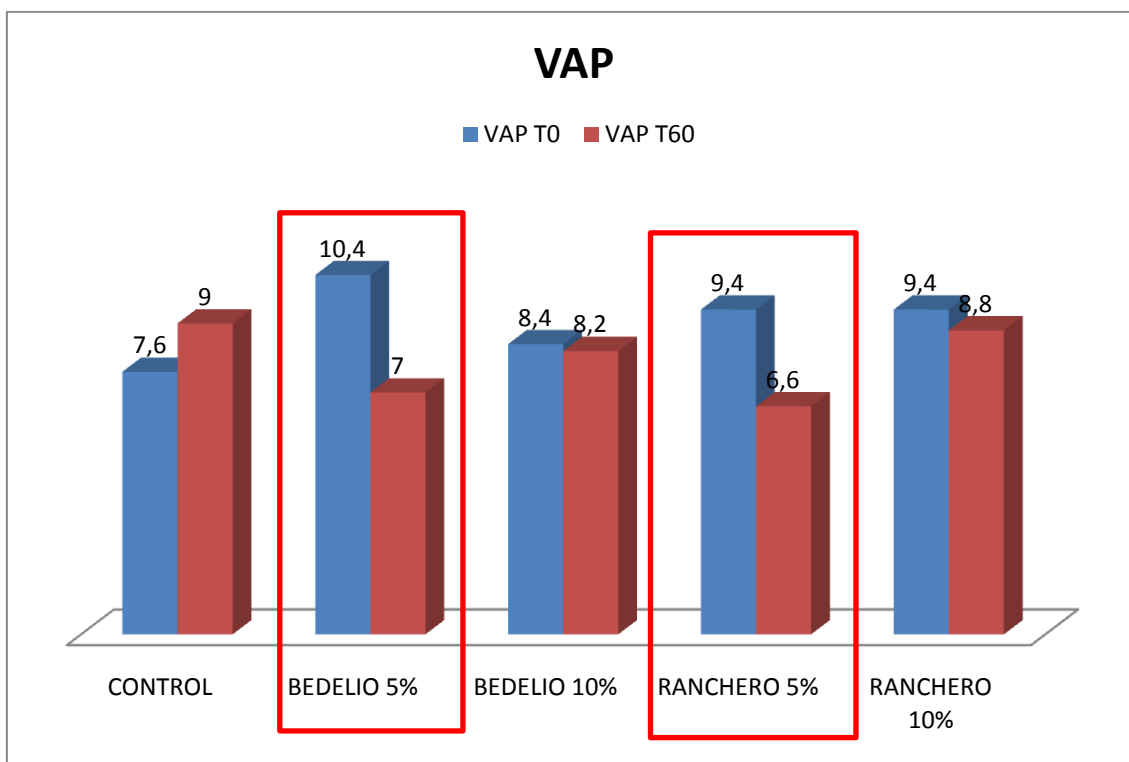


Grafico 6 Istogramma dei valori medi di VAP al tempo 0 (T0) in blu e al tempo 60 (T60) in rosso. Nei riquadri rossi sono evidenziati i campioni con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

VAP				
Campione	Tempo 0	Errore standard	Tempo 60	Errore standard
CONTROL	7,6	0,92736185	9	1,303840481
BEDELIO 5%	10,4	0,92736185	7	1,048808848
BEDELIO 10%	8,4	1,749285568	8,2	1,392838828
RANCHERO 5%	9,4	0,92736185	6,6	0,92736185
RANCHERO 10%	9,4	0,509901951	8,8	1,496662955

Tabella 5 Valori medi di VAP al tempo 0 (T0) e al tempo 60 (T60) con i relativi errori standard. In rosso i valori con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

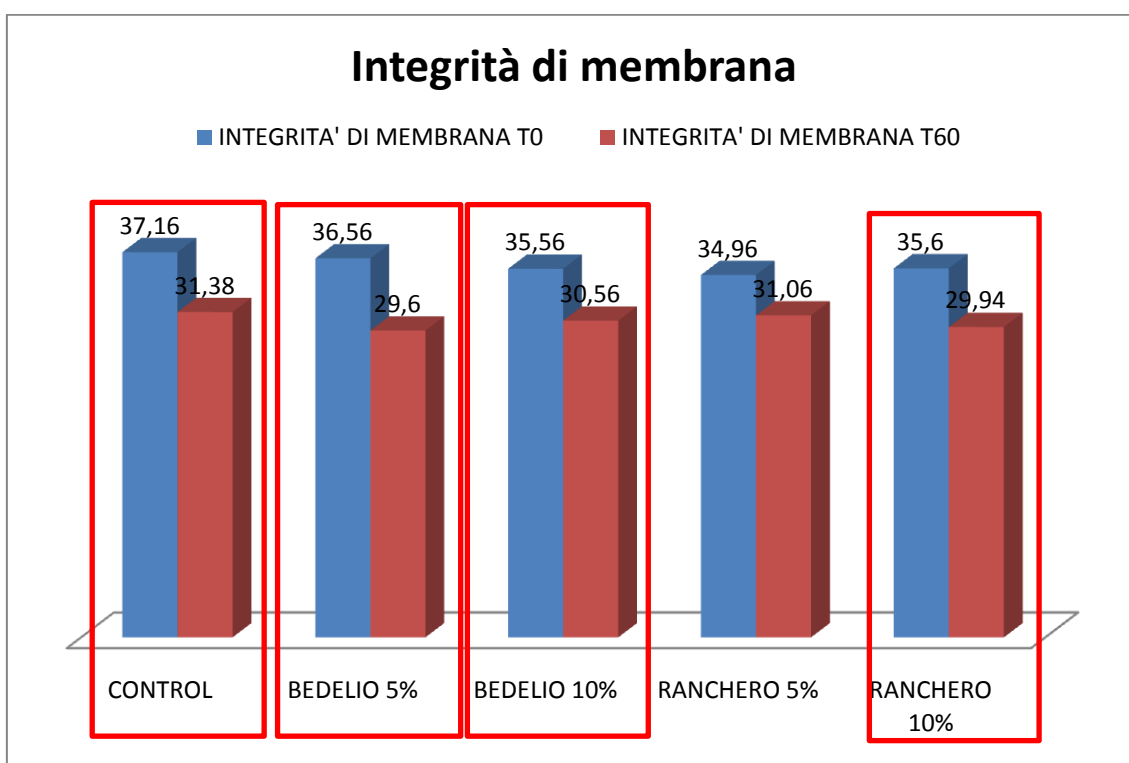


Grafico 7 Istogramma dei valori medi di Integrità di membrana al tempo 0 (T0) in blu e al tempo 60 (T60) in rosso. Nei riquadri rossi sono evidenziati i campioni con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

INTEGRITA' DI MEMBRANA				
Campione	Tempo 0	Errore standard	Tempo 60	Errore standard
CONTROL	37,16	1,619135572	31,38	1,652089586
BEDELIO 5%	36,56	1,852997572	29,6	2,4141251
BEDELIO 10%	35,56	1,860537557	30,56	2,402623566
RANCHERO 5%	34,96	1,767088	31,06	2,401166383
RANCHERO 10%	35,6	1,595932329	29,94	2,489096222

Tabella 6 Valori medi di Integrità di membrana al tempo 0 (T0) e al tempo 60 (T60) con i relativi errori standard. In rosso i valori con differenze significative ($\alpha \leq 0,05$).

Discussione e conclusione

I dati ottenuti non evidenziano sostanziali miglioramenti derivanti dall'aggiunta di plasma seminale al seme equino. In generale i valori dei campioni al T60 rivelano un peggioramento della qualità del seme rispetto agli stessi campioni al tempo T 0.

Entrando nel dettaglio per quanto riguarda la motilità totale si evidenzia una differenza significativa ($P \leq 0,05$) a favore del campione cui è stato aggiunto il 5% di plasma seminale di un “buon congelatore” rispetto al campione cui è stato aggiunto il 5% di plasma seminale di un “cattivo congelatore” (vedi Grafico 1).

Questa differenza apparentemente interessante non si riscontra in nessuno degli altri parametri presi in considerazione (motilità progressiva, VCL, VSL, VAP e integrità di membrana).

I dati ottenuti da questo esperimento ci inducono ad alcune considerazioni:

- Visto l'effetto sulla motilità totale, si potrebbe affermare che l'aggiunta di plasma seminale di un cavallo “buon congelatore” sia da preferire rispetto all'impiego del plasma seminale di un “cattivo congelatore”.
- Il fatto che gli altri parametri presi in considerazione non confermino questo effetto positivo, ci spinge ad essere prudenti nel supporre un concreto vantaggio nell'applicazione di questa tecnica. Considerato il fatto che la motilità progressiva, che come afferma *Pickett* (1993) sembra essere il parametro più correlato con la fertilità, non presenta differenze significative tra i due tipi di plasma utilizzati, sarebbe molto rischioso

fidarsi solamente della motilità totale per affermare che il plasma di un “buon congelatore” migliori la qualità del seme.

- Non è possibile affermare con i dati ottenuti dall'esperimento quale percentuale additiva di plasma seminale sia la preferibile, un 5% o un 10%. Secondo quanto affermano *Moore e Squires* (2004) l'ideale sarebbe un 5%, ma ricordiamo che nei loro lavori, questi hanno aggiunto il plasma prima del congelamento.
- L'effetto negativo che il tempo esercita sulla qualità del seme, pur non essendo ovviamente sorprendente, ci permette di escludere un effetto protettivo del plasma seminale. Il fatto che a distanza di un'ora tutti i campioni cui è stato aggiunto plasma seminale, a prescindere dalla sua provenienza e dalla sua concentrazione, mostrino un significativo peggioramento della qualità (cosa che in genere non si verifica per i controlli) apre pesanti interrogativi sull'impiego del plasma seminale.

Il contatto prolungato del plasma seminale con il seme sembra alterare il seme stesso, peggiorandone la qualità sia in termini di motilità che di integrità di membrana. Tutto ciò potrebbe essere spiegabile dalla presenza nel plasma seminale di qualche proteina o enzima o qualche altro costituente che con l'aumento del tempo di incubazione finisca per alterare buona parte degli spermatozoi. Tuttora non si conosce quale sia questo componente che esercita effetti negativi sul plasma seminale. Inoltre è logico pensare che il seme peggiori dopo un contatto prolungato con il plasma seminale anche solamente immaginando ciò che avviene fisiologicamente in natura. Il plasma veicola il seme dall'organo copulatore maschile a quello femminile, e poi una volta che gli spermatozoi sono stati depositati nell'utero della cavalla, finisce la sua funzione principale. Il tutto in natura si svolge in tempi molto brevi (si parla di minuti)

quindi non dovrebbe stupirci il fatto che il contatto per un'ora del plasma col seme ne peggiori le sue caratteristiche. Dobbiamo considerare inoltre un altro grande problema inevitabile negli studi di andrologia equina, ma in generale nella ricerca veterinaria: l'ampiezza del campione. Non è possibile lavorare con un grande numero di cavalli per ottenere un numero di dati sufficientemente ampio a rappresentare l'intera specie equina. Esistono inoltre notevoli differenze fra i singoli stalloni per quanto riguarda la quantità e la qualità del seme. Perciò risulta molto difficile ottenere dei dati uniformi. E' per questo che si è scelto di creare un pool di seme da sei diversi cavalli con lo scopo di ridurre le differenze tra i soggetti e tra le razze. Inoltre il plasma preso in esame proviene solamente da due cavalli, quindi potrebbe esistere un plasma con caratteristiche diverse che influisca in altra maniera sulla qualità del seme.

Dobbiamo tenere in conto inoltre ciò che affermano *Kuisma et al.* (2006): la motilità del seme è scarsamente correlata con fertilità in vivo dello stesso, perciò non può essere considerata come l'unico indice di qualità. *Jasko et al.* (1992) invece sostengono il contrario: i parametri di motilità presentano significative correlazioni con la fertilità. *Newcombe* (1999) riporta che i tassi di gravidanza per inseminazione diminuivano quando era utilizzato seme con bassa motilità. Mentre *Kirk et al.* (2001) sostengono che la VAP non sia un parametro affidabile e ripetibile. Per questo motivo basarci troppo sui parametri di motilità potrebbe indurci a conclusioni errate. Per questo si è deciso di introdurre il parametro dell'integrità di membrana in modo da avere un metodo d'analisi bifattoriale che aumenti la stima della fertilità, come sostengono *Kirk et al.* (2001) nel loro lavoro, considerando inoltre la motilità visiva, l'integrità dell'acrosoma e la funzione mitocondriale. Anche sull'integrità di membrana non abbiamo rilevato effetti positivi derivanti dall'aggiunta di plasma seminale.

Infine possiamo concludere che il nostro studio non conferma il risultato ottenuto da *Okazaki et al.* (2009) nei suini. L'aggiunta di plasma seminale post-scongelo non migliora la qualità del seme come era accaduto negli esperimenti di questi ricercatori con il seme di verro.

Concludendo si può dire che la sfida nell'andrologia equina rimane ancora aperta finché non saranno perfezionate le attuali analisi di laboratorio ed elaborato un sistema multi - parametrico di stima della fertilità. Le biotecnologie applicabili al seme congelato/scongelo sono in continuo progresso anche se non si è ancora scoperto un protocollo standard che riduca il peggioramento drastico della qualità del seme.

Appendice

Gli stalloni

Vengono presentati in questa appendice le principali caratteristiche distintive delle tre razze degli stalloni donatori di seme per gli esperimenti di questo lavoro, con al finale una breve descrizione di ogni singolo cavallo. Tutti gli animali erano ospitati nelle scuderie dell'ospedale clinico veterinario dell'Università di Extremadura, Cáceres, Spagna. I cavalli sono stati accuditi secondo gli standard europei in materia di allevamento e nutrizione equina, effettuando 2 prelievi di seme settimanali per ogni stallone.

Il cavallo Andaluso o Pura razza Spagnola (Pura raza Española)

La maggior parte dei cavalli presenti in Extremadura è di questa razza. Allevato in Europa e America del Sud, il luogo d'origine del cavallo di razza "Andaluso" o meglio conosciuto anche come "Pura razza Spagnola" è l'Andalusia (Spagna). Le origini di questo cavallo sono controverse: sembra discenda dai cavalli arabi e berberi giunti in Spagna con i Mori nel 711, incrociati successivamente con cavalli indigeni. Preferito già dagli Imperatori romani è stato il cavallo di Re e Condottieri, come testimoniano ritratti e statue in tutta Europa. Dall'Andaluso discendono i cavalli Lipizzani e nei secoli questa razza ha contribuito a creare molte razze europee ed americane.

Origini e storia

Al cavallo Andaluso si rifà il "Certosino" "cartujano", cavallo da sella e tiro leggero, grigio o morello, allevato solo in Spagna, derivato da selezione di Andalusi operata dalla fine del XV secolo dai monaci certosini di Jerez de la Frontera (Spagna) e molto simile all'attuale cavallo di "Pura razza Spagnola", ma

un po' più piccolo, più rustico e meno elegante. Il "Minorchino", altra razza spagnola discendente dall'Andaluso, non ancora riconosciuta ufficialmente, è un cavallo più spigoloso e meno elegante rispetto al progenitore, è molto utilizzato negli spettacoli circensi per la sua abilità ad impennarsi a comando.

Altezza: 155/160 cm al garrese.

Peso: 480/600 kg.

Attitudini ed utilizzo

Cavallo dal carattere fiero, intelligente, affettuoso, elegante, armonioso e di nobile portamento è un buon saltatore e viene utilizzato come cavallo da sella. L'"Andaluso" è un cavallo energico ma molto equilibrato, validissimo per le passeggiate, per gli sport equestri ed anche per le corride.

Particolari

Vanta un notevole equilibrio psicofisico, arti muscolosi e solidi, testa rettangolare lunga e secca con profilo diritto o leggermente convesso, fronte larga, occhi grandi scuri dallo sguardo vivace, garrese pronunciato e muscoloso, coda attaccata bassa e abbondante, spalla inclinata e muscolosa. Poiché per secoli con il nome di "Andaluso" si erano indicati genericamente i cavalli allevati in Spagna, l'Associazione degli allevatori Spagnoli lo ha praticamente abolito, sostituendolo con la denominazione "P.R.E. (Pura Raza Española) "

Cavallo Anglo-Arabo Spagnolo

L'Anglo-Arabo Spagnolo (o Hispano-arabe) è una razza di cavalli selezionata in Spagna intorno agli anni '60. E' il risultato dell'incrocio di giumente arabo-spagnole (con sangue andaluso) e stalloni purosangue inglesi. Utilizzato come

cavallo da lavoro con i tori da corrida e negli sport equestri (dal salto ostacoli al dressage); ottima monta da campagna per cavalieri esperti. È allevato per lo più in Spagna.

Caratteri morfologici

Tipo: dolicomorfo.

Mantello: baio, sauro, grigio.

Altezza al garrese: 150 - 160 cm.

Peso: 480 - 550 kg.

Carattere intelligente, coraggioso e affidabile.

Cavallo Anglo-Arabo Francese

Origini e attitudini

Il luogo d'origine è la Francia. E' stata ottenuta dal veterinario E. Gayot intorno al 1840, dopo vari tentativi, unendo le doti del purosangue e dell'arabo. Cavallo da sella impiegato per gli sport equestri, ottimo saltatore, ma richiede cavalieri esperti. Il suo portamento è fiero e nobile.

Caratteri morfologici

Tipo: dolicomorfo.

Mantelli principali: baio, sauro, grigio e morello (più rari).

Altezza al garrese: 155 - 168 cm.

Peso: 450 - 500 kg.

Testa piccola, fronte larga e orecchie piccole.

Pelle sottile e pelo corto e fine.

Carattere nevriale, coraggioso e leale.

BEDELIO

Andaluso o Pura razza spagnola, qualificato, baio, di 1,62 cm al garrese, figlio di LEGO e REA, deriva, dalle parte del padre, da LEBRIJANO III. Deriva dalle linee di Agente–Maluso, una delle linee più funzionali delle scuderie militari spagnole, che hanno dato stalloni molto importanti quali Invasor I ed Evento, entrambi cavalli olimpici. Rae, madre di Bedelio, figlia di Ocle e nipote di Bizarro XIV aveva come padre di Obcecado e Oleaje (cavallo olimpico).

CALIFA XXXVI

Pura razza spagnola, qualificato, grigio di 1,69 cm al garrese. E' figlio di Lego e di Cariñosa XV. Dalla parte della madre ha origini purissime. Attitudine: riproduttore, doma e accoppiamento.

RANCHERO (75 % Anglo-arabo spagnolo)

Nato nel 1996, dal mantello baio, di straordinaria bellezza. Ha numerosi figli iscritti e molti di loro qualificati. Ha gareggiato nella disciplina del Raid. È figlio di Shafeek e di Gaeta 50 %. Suo padre fu campione europeo e tra i migliori dieci del mondo, inoltre campione di Spagna nel 1987 e 1988.

FEU ARDENT (Anglo-arabo francese 32,61 %)

Stallone baio nato nel 1992. Anglo arabo francese da corsa (16 gare: 5 vittorie, 8 piazzamenti), vincitore sia in liscio (3 vittorie e 8 piazzamenti), come in steeple-chase (2 vittorie e 4 secondi posti). 1° in Steeple nazionale degli Anglo-arabi in Burdeos (4.100 m.), 1° in Gran steeple degli anglo-arabi in Pau (4.500 m.).

Cavallo ideale per fattrici da Raid, corsa e corsa ad ostacoli. Apporta solidità e un buon carattere. Stallone proprietà della associazione spagnola degli Anglo-arabi.

GIRALDILLO- RAM

Cavallo di pura razza spagnola dal mantello baio. Ha una altezza di 1.63 cm. al garrese. Discende dalle linee genetiche di Guardiola e Benitez-Cubero Pallares. Figlio diretto di Educado X; medaglia d'oro 4 volte in SICAB, campione di razza in Siviglia, Cordoba, Talavera e Oviedo. Campione dell'Andalusia nel 1999. Suo nonno Centella V fu campione di Spagna nel 1984. È un esemplare con eccellenti movimenti per la doma; ha un ottimo dorso e una conformazione solida e funzionale. Ha moltissimi fratelli che competono per bellezza, fra loro citiamo: DUQUE CXIII (campione di Spagna giovanile, SICAB 2008, Società internazionale del cavallo di pura razza spagnola), MARCHADOR-RAM, LLAMATIVA-RAM e KAZANA RAM (bronzo al SICAB 2008). È proprietà dell'ospedale clinico veterinario.

CHOCOLATE

Stallone nero di 6 anni di età, con origini andaluse dell'allevamento della scuola militare spagnola. Domato al dressage presenta un buon carattere. Trasmette il mantello nero. È proprietà di Abel Baca Salas.

Bibliografia

- Almid T, Johnson LA. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *Journal of Animal Science* 1988; 66: 2899–2905.
- Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science* 1987; 7: 145–73.
- Amann RP, Graham JK. Spermatozoal functions. *Equine Reproduction*, Philadelphia, London 1993: 715-740.
- Amman RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *Journal of Andrology* 1993; 14: 397–406.
- Givan AL, *Flow cytometry: first principles*. NY: Wiley-Liss; 1992
- Donoghue AM, Garner DL, Donoghue DJ, Johnson LA. Viability assessment of turkey sperm using fluorescent staining and flow cytometry. *Poultry Science* 1995; 74: 1191–1200.
- Garner DL, Pinkel D, Johnson LA, Pace MM. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining flow cytometric analyses. *Biology Reproduction* 1986; 34: 127–138.
- Garner DL, Johnson LA, Yue ST, Roth BL, Haugland RP. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *Journal of Andrology* 1994; 15: 620–9.
- Garner DL, Johnson LA. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biology Reproduction* 1995; 53: 276–284.

- Gundersen GG, Shapiro BM. Sperm surface proteins persist after fertilization. *Journal of Cell Biology* 1984; 99: 1343–1353.
- Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990; 88: 343–52.
- Hunter A.G. and. Nornes HO. Characterization and isolation of a sperm-coating antigen from rabbit seminal plasma with capacity to block fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility* 1969; 20: 419-427.
- Idziorek T, Estaquier J, de Bels F & Ameisen JC. YOPRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability. *Journal of Immunological Methods* 1995; 185: 249–285.
- Jasko DJ, Little TV, Lein DH, Foote RH. Comparison of spermatozoa movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1992; 200: 979-985.
- Kavak A, Johannisson A, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H, Aidnik M, Einarsson S. Evaluation of cryopreserved stallion semen from Tori and Estonian breeds using CASA and flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 2003; 76: 205–16.
- Kirk ES, Graham JK, Bruemmer JE, Squires EL. Evaluating frozen equine semen by flow cytometry. *Animal reproduction science* 2001; 68: 348-349.
- Kosiniak, K. Characteristics of the successive jets of ejaculated semen of stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 1975. Suppl. 23: 59–61.

- Kuisma P., Andersson M., Koskinen E., Katila T., Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2006.
- Larsson B, Rodriguez Martinez H. Can we use in vitro fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science* 2000; 60–61: 327–336.
- Matyus L, Szabo Jr G, Resli I, Gaspar Jr R, Damjanovich S. Flow cytometric analysis of viability of bull sperm cells. *Acta Biochimica et Biophysica; Academiae Scientiarum Hungaricae* 1984; 19: 209–214.
- McKinnon AO, JL Voss. *Equine Reproduction*, Philadelphia, London 1993
- Moore AI, Squires EL, Ghraham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 2004; 63: 2372–2381.
- Newcombe JR. Evaluation of the fertilizing capacity of frozen-thawed horse semen. *The veterinary record* 1999; 145: 46,47.
- Okazaki T, Abe S, Yoshida S, e Shimada M. Seminal plasma damages sperm during cryopreservation, but its presence during thawing improves semen quality and conception rates in boars with poor post-thaw semen quality. *Theriogenology* 2009; 71: 491-498.
- Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, Davies R, Fearnhead H & Cohen GM. Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes: a flow cytometric study. *Cytometry* 1993; 14: 595–602.

- Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992; 29: 255-66.
- Pickett BW. Seminal extenders and cooled semen. *Equine reproduction*. Philadelphia 1993.
- Resli I, Gaspar R, Szabo G, Matyus L, Damjanovich S. Biophysical analysis of fertility of sperm cells. *Magyar Allatorvosok Lapja (Hungarian veterinary journal)* 1983; 38: 38–41.
- Sieme, H., Katila, T., Klug, E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 2004; 61: 769–784.
- Tischner M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 1979: 58–59.
- Viguier, J. M., *Reproducción e inseminación artificial en animales*, E.S.E Hafez, 1987: 47.
- Wilhelm KM, Graham JK, Squires EL. Comparison of the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa with sperm motion analyses, flow cytometric evaluation, and zona-free hamster oocyte penetration. *Theriogenology* 1996; 46: 559–78.
- Wronsky R, Golob N, Grygar E & Winsdish M. Two color, fluorescence–based microplate assay for apoptosis detection. *BioTechniques* 2002; 32: 666–668.

Ringraziamenti

“...non datemi l'amore, non il denaro, non il lavoro, non la famiglia, non la giustizia, quello che voglio è la verità.” (Christopher Mccandless)

Ringrazio vivamente il mio relatore Antonio Mollo per aver reso possibile questo progetto ed essersi battuto affinché potesse realizzarsi.

Allo stesso modo ringrazio il settore spagnolo del progetto: Fernando e Cristina che mi hanno accolto nel loro laboratorio e aiutato in tutto. Antolin, Bea, Clara e Juanma che mi sono stati vicino e mi hanno trasmesso il loro entusiasmo e la voglia di conoscere.

Ringrazio in primo luogo la mia famiglia ma soprattutto mia mamma che dopo tante fatiche e problemi può finalmente realizzare il sogno di vedermi laureato, mia sorella che ha vigilato sui miei studi dandomi sempre utili consigli e la nonna per la sua vicinanza costante.

Ringrazio i miei amici di sempre: Pecchia, Ciccio, Giorgio, Raffo, Paolo, Lucia che hanno accompagnato i miei giorni di svago e felicità ma anche quelli di sconforto.

Una dedica particolare al mio compagno di avventure e di studio Sex che oltre ad essere stato un coinquilino eccezionale mi ha dato sempre utili consigli di vita e Angela, che con la sua energia mi ha caricato e consolato nei momenti bui.

Ringrazio infine il gruppo scout Adria 2, che mi ha trasmesso fin da giovane lupetto il desiderio di conoscere il mondo e di poterlo migliorare, di amare e rispettare la natura con tutte le sue forme di vita.

Un grazie infine a tutti i miei amici Erasmus che mi hanno regalato un anno eccezionale.