

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO
IN
MEDICINA VETERINARIA

Espressione dei geni LDHC, Sam68, SP22 in stalloni con diversa fertilità.

LDHC, Sam68, SP22 genes expression in stallions with different fertility.

Relatore:

Professoressa Maria Elena Falomo

Dipartimento di Medicina animale, Produzioni e Salute

Correlatore:

Professoressa Barbara Zavan

Laureando:

Alberto Bolfe

Matricola n. 561539/MV

ANNO ACCADEMICO 2012- 2013

A mia madre e mio padre

Indice

1 Introduzione	1
1.1 La cellula spermatica	1
1.1.1 Organizzazione e attività del nucleo	1
1.1.1.1 Il blocco della trascrizione	1
1.1.1.2 Il contenuto in RNA	2
1.1.2 Organizzazione del DNA nello spermatozoo dei mammiferi	2
1.1.2.1 Volume nucleare e strutturazione del DNA	2
1.1.2.2 Le protamine	4
1.2 Andrologia equina: stato dell'arte	5
1.2.1 Esame fisico dello stallone	5
1.2.2 Valutazioni di routine del seme di stallone	6
1.2.2.1 Concentrazione del materiale seminale	6
1.2.2.2 Motilità del materiale seminale	7
1.2.2.3 Morfologia del materiale seminale	8
1.2.3 Nuovi orizzonti	9
1.2.3.1 Valutazione della cromatina	9
1.2.3.2 I markers genetici, quadro generale	9
1.3 Markers genetici e fertilità	12
1.3.1 Il gene Sam68	12
1.3.1.1 Sam68: marker di fertilità	13
1.3.2 Il gene LDHC	15
1.3.2.1 I geni della famiglia LDH e le loro proteine	15
1.3.2.2 Controllo trascrizionale del gene LDHC	16
1.3.2.3 Controllo traduzionale e mRNA	17

1.3.2.4 Funzione dell'isoenzima LDH-C4 e conseguenze di una carenza	18
1.3.3 Il gene SP22	19
1.3.3.1 La proteina SP22	19
1.3.3.2 Alterazioni nell'espressione della SP22 e sua ipotetica funzione	19
2 Obiettivi dello studio	21
3 Materiali e metodi	22
3.1 Prelievo del materiale seminale	22
3.2 Analisi sul materiale seminale	22
3.3 Estrazione dell'mRNA	22
3.4 Quantificazione dell'RNA estratto	24
3.5 La RT-PCR	25
3.7 La real-time PCR	26
4 Risultati	28
4.1 Espressione del gene Sam68	29
4.2 Espressione del gene LDHC	31
4.3 Espressione del gene SP22	34
5 Discussione	37
6 Conclusioni	41
7 Bibliografia	43
8 Ringraziamenti	51

1 Introduzione

1.1 La cellula spermatica

1.1.1 Organizzazione e attività del nucleo

La cellula aploide differisce nella sua ultrastruttura più intima, rappresentata dal nucleo, rispetto alle altre cellule somatiche diploidi.

Il nucleo delle cellule somatiche gode di una sua indipendenza fisica dalla membrana cellulare, è formato dal suo *envelope* che contiene dei pori, dal nucleolo, da due centrioli e dal materiale genico, il DNA, circondato da nucleosomi che gli garantiscono dimensioni, forma e funzioni specifiche. Troviamo in esso anche RNA e una serie di proteine con specifiche funzioni.

Questa struttura è mantenuta per tutte le cellule somatiche ma non completamente per le cellule della linea germinale, che nei testicoli vanno incontro al processo di divisione meiotica ¹.

I due momenti più importanti della meiosi, in relazione al cambiamento dell'assetto nucleare, sono la seconda metà della spermatogenesi e la spermiogenesi, durante i quali avviene nell'ordine il blocco della **trascrizione** e la sostituzione di parte degli istoni nei nucleosomi con proteine basiche, le **protamine**^{2,1}.

Attorno al materiale genico nucleare si vengono quindi a formare delle sottili fibre, che avvicinandosi le une alle altre danno origine ad una massa omogenea densa, dando così origine all'aspetto del nucleo nella cellula spermatica matura³.

Il nucleo, inoltre, perde la sua indipendenza dalla membrana cellulare, unendosi ad essa per la formazione, nel polo craniale, dell'acrosoma e nel polo caudale, della coda ¹.

1.1.1.1 Il blocco della trascrizione

Una volta conclusa la formazione degli **spermatidi intermedi**, si assiste al blocco completo o silenzio trascrizionale della cellula aploide.

Da questo momento in poi il nucleo non trascrive più nulla e i trascritti che serviranno nelle fasi successive di differenziazione cellulare sono preventivamente stati stoccati sotto forma di mRNA e micro-RNA nucleari, per essere utilizzati durante la spermiogenesi².

1.1.1.2 Il contenuto in RNA

Fino a pochi anni fa molti andrologi erano pienamente convinti che la cellula spermatica, una volta conclusa la spermiogenesi e la fase di maturazione e capacitazione, fosse solamente un trasportatore del corredo cromosomico maschile senza nessun'altra funzione tranne quelle di attivazione della cellula uovo e di donazione del centriolo spermatico⁴.

Recenti studi, soprattutto in campo umano, hanno dimostrato che non solo la cellula in via di maturazione stocca, nel momento dell'arresto della trascrizione, dei trascritti che verranno utilizzati nelle fasi seguenti di maturazione ma che anche nello spermatozoo maturo, che noi ritroviamo nell'eiaculato, ci sono dei trascritti presenti.

Questi si ritrovano prevalentemente sotto forma di mRNA e di micro-RNA nucleari che possono essere considerati come delle vere e proprie "impronte" di quella che è stata l'attività trascrizionale della cellula prima del silenzio trascrizionale².

Il loro ritrovamento ha permesso di mirare a due obiettivi, ossia il loro uso a fini diagnostici, potendo studiare l'espressione genica di determinate proteine dal punto di vista quali-quantitativo e inoltre capire il loro potenziale coinvolgimento nello sviluppo embrionale seguente alla penetrazione dello spermatozoo nella cellula uovo, ribaltando la teoria che la cellula spermatica sia solamente un carrier del genoma paterno⁵.

1.1.2 Organizzazione del DNA nello spermatozoo dei mammiferi

1.1.2.1 Volume nucleare e strutturazione del DNA

Il materiale genetico, nella cellula spermatica, è organizzato in modo diverso da quello delle altre cellule somatiche per due motivi principali:

il primo legato al differente volume nucleare presente nello spermatozoo ed il secondo per garantire a queste cellule delle specifiche funzioni, strettamente legate al loro potenziale di fertilità.

Da uno studio condotto su animali di laboratorio, è stato rilevato che se il DNA fosse organizzato come nelle altre cellule somatiche, avremo bisogno di un volume nucleare circa doppio per contenerlo ⁶.

Se nella cellula somatica il materiale genetico è strutturato secondo una figura solenoide, in cui il DNA si avvolge attorno ad ottameridi istoni, nella cellula spermatica la figura è un toroide, attorno al quale si avvolge il DNA.

Questa struttura si presenta lineare e organizzata in modo che le **protamine** che sostituiscono gli istoni durante la spermiogenesi vadano a collocarsi sulla scanalatura minore della doppia elica di DNA lasciando libera la scanalatura maggiore per la formazione di legami con le doppie eliche di DNA confinanti.

L'unità formata dall'accoppiamento DNA-protamine è a sua volta rinforzata dalla formazione di ponti disolfuro, che permettono un maggiore compattamento e riduzione di ingombro di questa particolare struttura molecolare⁶.

Un altro aspetto da ricordare è che l'elica di DNA non è superavvolta come nelle cellule somatiche e questo è dovuto proprio alla presenza delle **protamine** e alla linearità dell'intera struttura all'interno del nucleo spermatico.

Il superavvolgimento dato dagli istoni permette uno srotolamento del DNA e un disaccoppiamento dei filamenti nel momento in cui venisse a mancare l'appaiamento tra le basi, cosa che non succede con le **protamine** che inducono solamente un semplice avvolgimento^{7,8}.

Si ricorda anche che una piccola parte di DNA nel nucleo spermatico rimane ancora organizzato attorno ad ottameridi istoni, nell'uomo circa il 15%.

Nel nucleo spermatico dei mammiferi è stato dimostrato che ci sono delle porzioni di cromatina specificatamente associate ad istoni e altre, la maggior parte, specificatamente associate alle **protamine** e ciò implica che gli istoni sono sostituiti con le protamine secondo uno specifico piano che rimanda dunque a due funzioni diverse delle due forme in cui si ritrova organizzata la cromatina nello spermatozoo ⁶.

1.1.2.2 Le protamine

Il termine **protamine** fu coniato la prima volta nel 1874 da Friederich Miescher per identificare delle “basi organiche” associate alla “nucleina” (attuale acido nucleico) nel nucleo spermatico del Salmone del Reno.

Questa famiglia di proteine basiche caratterizza la struttura di sostegno del DNA dalla spermiogenesi fino al momento della penetrazione della cellula uovo da parte dello spermatozoo.

Sono stati identificati fino ad oggi due gruppi principali di queste proteine, identificate come **protamineP1** e **protamineP2**, queste ultime presenti solo in alcuni mammiferi inclusi gli equidi e l'uomo ⁹.

In campo umano la protamina **HP1** rappresenta il primo gruppo e le protamine **HP2**, **HP3** e **HP4** il secondo.

Le protamine sono caratterizzate dal contenere elevate quantità di *arginina* e *cisteina*, mentre il loro contenuto in *istidina* e *tirosina* varia tra gruppi ¹.

In uno studio effettuato su animali di laboratorio, il contenuto in arginina delle protamine, in gruppi carichi positivamente, sembra contrastare i gruppi fosfato del DNA, carichi negativamente⁶.

In tutte le specie di mammiferi considerate, l'analisi della sequenza aminoacidica delle **P1** risulta formata da una catena di 50 aminoacidi, con un core centrale ricco in arginina che si presume essere quello che si lega al DNA. Il gruppo delle **P2** contiene invece dai 54-63 aminoacidi e contiene un elevato tenore in istidina e uno minore in tirosina rispetto alle P1.

Nelle protamine P1 si è visto che nella porzione amino-terminale si ritrova la specifica sequenza alanina-arginina-tirosina-arginina-cisteina, che potrebbe rappresentare il sito di fosforilazione della proteina. La fosforilazione risulta essere molto importante per il legame tra protamina e molecola di DNA e altrettanto importante risulta essere la defosforilazione, che permette invece un maggior compattamento della struttura DNA-protamine¹.

1.2 Andrologia equina: stato dell'arte

Con l'avanzare di nuove tecniche biomolecolari, anche il settore della Riproduzione veterinaria, in campo equino, si apre a nuove frontiere che permetteranno una maggiore efficacia nella valutazione e certificazione del materiale biologico commercializzato.

Fino ad oggi si è prestata, giustamente, moltissima attenzione al management riproduttivo delle fattrici e allo studio dei problemi di fertilità in questi soggetti, in quanto, specialmente nel settore dei cavalli da sella, si vede una popolazione di fattrici con età media superiore ai 12 anni e con elevata frequenza di patologie endometriali.

Motivi commerciali hanno ad oggi rallentato la selezione dei riproduttori maschi sulla base della loro fertilità, privilegiando la loro popolarità ed è per questo che la gestione riproduttiva dello stallone è rimasta leggermente più indietro dal punto di vista delle metodologie rivolte alla valutazione della fertilità, nello specifico a livello dello studio del materiale seminale; la valutazione del seme secondo i parametri di **concentrazione**, **motilità** e **morfologia** in aggiunta ad un approfondito esame fisico del soggetto rimangono ancora oggi i capisaldi dell'andrologia in campo equino¹⁰.

Esistono, in relazione a questi parametri, delle indicazioni sulle caratteristiche minime della dose fecondante commercializzata ma ad oggi restano solo raccomandazioni che non pregiudicano la commercializzazione di materiale seminale scadente.

Sorge quindi la necessità di aprire i confini a nuove tecniche in grado di dare valutazioni sempre più univoche e certe sul materiale seminale.

1.2.1 Esame fisico dello stallone

Per ottenere materiale seminale di buona qualità non si può in modo alcuno sottovalutare lo stato di salute generale del soggetto, che deve costantemente essere gestito nel modo migliore, per ciò che riguarda parametri basilari, quali pulizia, benessere e corretta alimentazione e parametri clinici, che vanno monitorati periodicamente.

L'esame fisico si completa con l'esame obiettivo particolare del sistema riproduttore maschile. Si valutano con attenzione il prepuzio, il glande, il processo uretrale e lo scroto

per poi passare a strutture più interne quali gli anelli inguinali esterno ed interno, percepibili con l'esplorazione rettale e le ghiandole accessorie.

In questo ci viene in aiuto anche la diagnostica per immagini, con l'ecografia¹¹.

Durante queste valutazioni si devono sempre osservare dei punti critici, che potrebbero presentare traumi e la cui igiene quotidiana deve essere un presupposto per ottenere un eiaculato di elevata qualità microbiologica e poter garantire la massima fertilità¹¹.

Non meno secondaria è la valutazione della presenza di entrambi i testicoli nello scroto, della loro dimensione e consistenza; se variati, questi parametri, sono indicativi di patologie testicolari. La dimensione testicolare nello stallone, valutata ecograficamente, è correlata con la DSO (produzione giornaliera e rilascio di sperma), a sostegno dell'importanza della valutazione particolare del testicolo¹².

1.2.2 Valutazioni di routine del seme di stallone

Il materiale seminale in commercio, viene routinariamente valutato sulla base delle seguenti caratteristiche:

1.2.2.1 Concentrazione del materiale seminale

Il numero totale di spermatozoi nell'eiaculato viene stimato con le seguenti metodiche:

1. Al microscopio ottico con camera di conta;
2. Allo spettrofotometro;
3. Con il *computer-assisted spermatozoal analysis* (CASA) e con l'analizzatore computerizzato di immagini;
4. Con la citometria di flusso, che consente, dopo marcatura del seme con *Iodio propidio* sia la valutazione della concentrazione dell'eiaculato, che la stima della funzionalità spermatica, essendo una sonda che si lega al DNA¹³.

Le camere di conta e lo spettrofotometro sono quelli maggiormente utilizzati nei centri stalloni, anche per la loro convenienza economica. Con il primo si parte dal seme diluito 1:100 che si carica nell'emocitometro e dopo un'attesa di 5' si procede alla lettura con microscopio ottico, con il secondo si deve possedere l'apparecchiatura spettrofotometrica, che se ben settata, con lettura duplicata all'emocitometro, fornisce risultati attendibili¹¹.

La citofluorimetria di flusso apre certamente nuovi orizzonti ma al momento risulta ancora troppo onerosa per essere economicamente ammortizzabile dai centri di produzione di materiale seminale equino.

1.2.2.2 Motilità del materiale seminale

Questo è un parametro che viene sempre valutato, sia sul seme tal quale, che addizionato all'*extender*, mezzo che viene utilizzato di routine per sostenere a livello energetico gli spermatozoi e fornire loro un sistema tampone e limitare la crescita batterica.

Il seme tal quale permette la valutazione della motilità spermatica nei fluidi secreti dalle ghiandole accessorie, però gli spermi, in questo veicolo, tendono ad agglutinare sul vetrino e dare problemi di visualizzazione. A questo si ovvia con l'aggiunta dell'*extender*, che però può dare dei problemi, tendendo ad aumentare inizialmente la motilità o, in alcuni soggetti, di dare il tipico andamento circolare degli spermatozoi.

Questo parametro si può valutare sia con il microscopio a contrasto di fase che con strumenti computerizzati, meglio conosciuti con la definizione inglese di *computer-assisted-spermatozoal-analysis* (CASA). La valutazione al microscopio ha una grande attendibilità, a patto che sia fatta da personale con anni di esperienza e resta comunque una valutazione soggettiva ¹⁰.

I mezzi computerizzati, che abbiamo definito con l'acronimo inglese CASA, fecero la loro prima comparsa alla terza conferenza internazionale sullo spermatozoo, nel 1978.

Da quel momento in poi sono stati fatti molti progressi, fino alle più recenti tecnologie per la valutazione della motilità spermatica, rappresentate dal CellSoftsystem e dall'HTM-S (Hamilton-S) ¹⁴.

Questi strumenti computerizzati, in particolare quest'ultimo, trovano un largo impiego nei centri stalloni per la valutazione degli spermi motili e progressivamente motili (spermi con una motilità più alta rispetto ai livelli soglia e con andamento rettilineo), parametri considerati indici importanti nella fertilità generale del soggetto ¹⁰.

Pur fornendo una **misurazione oggettiva**, non sono esenti da deficit, in primo luogo perché valutano la sola motilità, senza associarla ad altri parametri come la morfologia e in alcuni casi questo è molto negativo in quanto alcuni spermi con motilità elevate ma

morfologia scarsa hanno una bassissima fertilità. Rimane quindi un dato singolo, senza correlazioni, che devono essere fatte con altre metodiche e ulteriore impiego di tempo.

In secondo luogo moltissimi laboratori tendono a mantenere le impostazioni standard del macchinario, fornite dalla ditta, senza contestualizzarle nella realtà specifica dell'azienda e questo è molto negativo, in quanto il dato fornito non può essere considerato come un "gold standard" perché non esiste una standardizzazione di com'è la motilità dello sperma nel tragitto che fa dall'epididimo alla cellula uovo, motilità tra l'altro influenzata dalla tipologia di preparazione del seme specifica di ciascun laboratorio.

Il passo avanti da farsi, per questa tecnologia, sarebbe quello di poter associare, contemporaneamente alla lettura della motilità, una lettura morfologica; inoltre sarebbe importante che nel tempo questi sistemi avessero rivelato dei collegamenti, identificabili con variazioni di motilità, tra espressione biochimica e stato genomico e proteico della cellula, **aspetti che si stanno affrontando con l'avvento dell'era genomica¹⁴**.

1.2.2.3 Morfologia del materiale seminale

La morfologia viene valutata al microscopio a contrasto di fase oppure al microscopio a contrasto interferenziale e in base al laboratorio di analisi i campioni vengono sottoposti a colorazione citologica normale (Wright's, Giemsa, ematossilina-eosina) oppure fissando il campione in formalina senza colorarlo, metodo, quest'ultimo, che riduce di molto la presenza di artefatti ^{11,10}.

Le variazioni morfologiche sono classificate come **primarie**, **secondarie** e **terziarie**. Sono considerate primarie le modificazioni che avvengono in sede testicolare, secondarie quelle che avvengono nel tragitto a livello dei deferenti e terziarie quelle da errata gestione dei campioni.

Oggigiorno si preferisce valutare la tipologia e la quantità di variazioni morfologiche presenti in un numero determinato di spermatozoi senza associarle ad una categoria specifica, in quanto una singola variazione può essere di origine primaria, secondaria o terziaria. Tra le malformazioni più frequenti si annoverano le teste spermatiche staccate, le code piegate e le gocce protoplasmatiche prossimali.

Solitamente la morfologia è correlata positivamente alla motilità progressiva, anche se, come abbiamo già ricordato prima, spermatozoi con buona/elevata motilità possono essere

infertili e inoltre dobbiamo ricordare che spermatozoi morfologicamente anormali non influenzano negativamente quelli normali¹⁰.

1.2.3 Nuovi orizzonti

Con l'avvento dell'era genomica si sono aperte delle nuove opportunità per lo studio del materiale seminale, grazie alla possibilità di valutare delle strutture considerate “nascoste” all'occhio del ricercatore.

1.2.3.1 Valutazione della cromatina

Lo spermatozoo maturo, come già si ricordava nel corso del primo capitolo, presenta una cromatina molto condensata, dovuta alla presenza delle **protamine**⁶.

Nel 1980 fa la sua prima comparsa, con Evenson, il Saggio per la valutazione della cromatina spermatica (SCSA) che valuta, dopo denaturazione della cromatina con acido, i danni presenti al DNA grazie all'impiego dell'*arancio di acridina*, colorante citologico. La lettura viene svolta grazie alla citometria di flusso, mezzo ottico che permette la valutazione di cellule, fluenti in un mezzo liquido.

Le affezioni cui può andare incontro il DNA si situano sia nelle molecole mono filamento che doppio filamento e inoltre a livello dei nucleosidi.

Questa tecnica è molto importante e lo sarà ancora di più nel futuro, in associazione alle nuove scoperte sui **marker genetici**, in quanto spesso non ci sono correlazioni tra danni al DNA da deficit di struttura cromatica e valutazioni di routine sul seme, quali carenze di motilità e morfologia¹⁰.

1.2.3.2 I markers genetici, quadro generale

La fertilità dello stallone ha un notevole impatto economico e per dare risposte sempre più certe riguardo il profilo del materiale seminale commercializzato, la ricerca in riproduzione equina si è unita in sinergia con ricerche in umana e su animali da laboratorio, scoprendo una grande varietà di potenziali marcatori genetici che daranno la

possibilità di identificare soggetti ipofertili e patologie della riproduzione, con grande attendibilità di risultati.

Tra i geni in studio, come potenziali marcatori legati alla problematica dell'**intersessualità**, abbiamo il **gene SRY** collegato a problemi di sviluppo dell'apparato genitale e il gene **AR** per i recettori degli androgeni.

Ci sono moltissimi studi riguardanti **anomalie autosomiche**, quali trisomie o delezioni, riguardanti ampie porzioni di cromosoma.

Si pone molta attenzione allo studio sui potenziali marcatori genetici collegati al **criptorchidismo**, problematica sempre più presente in andrologia equina.

Questi geni sono l'**INSL3** (gene che codifica per l'*Insulin-likefactor 3*) e quello che codifica per il suo recettore, l'**LGR8**¹⁵.

Anche gli **estrogeni** giocano un grande ruolo nello sviluppo dell'apparato genitale maschile e nello sviluppo spermatico. Lo studio di Parlevliet et al. dimostra la presenza di recettori per gli estrogeni **ESR1** e **ESR2** a livello epididimale ¹⁶.

In uno studio incrociato in umana ¹⁷, si è visto come delle variazioni nei geni codificanti i recettori sopra menzionati abbiano influenze su concentrazione spermatica e criptorchidismo.

Sono stati svolti studi anche sulla **relaxina** e i suoi geni, l'**RLN** e i tre geni non allelici **RLN 1-2-3**. La relaxina è coinvolta nello sviluppo dell'apparato riproduttore maschile, nella crescita della prostata e nella motilità spermatica.

Sono stati oggetto di studio i geni che controllano l'espressione degli ormoni essenziali per la riproduzione e i loro recettori, quali il **GNRH**, l'**FSH** e l'**LH**.

Attenzione è stata riservata all'**Inibina**, all'**Activina** e alla **Follistatina**, quest'ultima inibisce la secrezione di FSH legandosi all'activina. La concentrazione di inibina sembra invece essere collegata con la maturazione testicolare e con la fertilità in generale.

I geni coinvolti, quali l'**INHA**, **INHBA** e l'**INHBB** per l'*alfa* e *beta* inibina e l'**ACTN**, l'**ACTB** e l'**ACTG** per l'*alfa* e *beta* actina potranno divenire markers molto importanti per la valutazione di problematiche di fertilità nello stallone¹⁵.

Sono presenti numerosi studi anche sulla **Prolattina** e il suo gene, il **PRL** e il gene codificante il suo recettore, il **PRLR**. Da uno studio di GERLACH et al, la

concentrazione di prolattina circolante è influenzata dalle ore di luce, ed è massima durante il periodo riproduttivo.

La **spermatogenesi** è stata a fondo studiata per capire quali geni siano coinvolti nel suo controllo e che cosa possa turbare la sua regolare funzionalità.

La proteina associata alla spermatogenesi, la **SPATA1** e quindi la sua espressione genica, sono coinvolte nella morfologia e dimensioni delle teste spermatiche.

La proteina **CRISP3** è molto importante per la protezione degli spermatozoi nel loro tragitto nelle vie maschili ma ancor più per evitare che vengano eliminati dai neutrofilo polimorfonucleati, una volta arrivati in utero.

Altro gene molto importante è l'**ACE** (gene per l'enzima di conversione dell'angiotensina), le cui proteine sono localizzate a livello epididimale, negli spermatidi in formazione e negli spermatozoi maturi. Studi su animali da laboratorio, con delezione di detto gene, hanno dimostrato deficit di motilità spermatica e incapacità degli spermatozoi di legarsi alla zona pellucida dell'ovocita¹⁸.

Sono presenti molti geni e proteine, ad essi collegati, che regolano **l'interazione tra lo spermatozoo e la zona pellucida**. Tra di esse si ricordano la **ZAN** (proteina di membrana dello spermatozoo, coinvolta nel legame con la zona pellucida), l'**ACR** (acrosina) e la **SP38**, quest'ultima partecipa al legame tra lo spermatozoo e la cellula uovo, una volta avvenuta la reazione acrosomale.

La famiglia di **geni ADAM** è coinvolta invece nell'**interazione tra spermatozoo e cellula uovo**, assieme al gene **PLCz** il cui prodotto è coinvolto nell'oscillazione del Ca^{2+} a livello dell'ovocita e una sua carenza nello stallone porta ad ipofertilità, cosa che permette di pensare ad un suo ruolo come specifico marcatore genico di fertilità¹⁵.

Molti geni target e loro proteine sono coinvolti anche nella **motilità spermatica**, tra questi si ricordano il gruppo dei geni **CATSPER**, che codificano per proteine transmembrana, il gene per l'adenilato-ciclastasi (**SAC**) che regola una serie di segnali coinvolti nella motilità, la **PROTEINA-CHINASI A** e infine il **GAPDHS** (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi), che ha un ruolo specifico nel metabolismo spermatico¹⁹.

Altra famiglia di geni target è rappresentata dalle **protamine**, questa famiglia di nucleoproteine basiche, per ricordare quanto già precedentemente detto, ha grande influenza sulla fertilità dei soggetti in riproduzione, espletando almeno tre funzioni molto

importanti; danno infatti stabilità al DNA spermatico condensando la cromatina in una struttura compatta ²⁰, assicurano **motilità** e quindi capacità di movimento coordinato nelle vie femminili e il raggiungimento rapido della cellula uovo e forniscono protezione al DNA da parte di agenti quali **nucleasi** o agenti **mutageni** provenienti dall'ambiente intra ed extra cellulare.

Altre funzioni molto importanti da ricordare sono la possibilità che aree di genoma compattate da queste proteine non siano disponibili subito, dopo la fertilizzazione, all'ingresso nella fase attiva di trascrizione e che quindi ci sia una regolazione dell'imprinting paterno alla futura generazione; inoltre può esserci una competizione di queste proteine verso fattori di trascrizione specifici e infine potrebbero svolgere un ruolo di controllo durante la spermatogenesi ²¹.

L'informazione genetica, per questa famiglia di proteine, risiede in due geni, il **PRM1** e il **PRM2**, anche se recentemente si è evidenziata la presenza di un quarto gene, il *prm3*, la cui appartenenza funzionale alle protamine rimane in discussione ²¹.

1.3 Markers genetici e fertilità

Nell'ambito delle nuove frontiere dell'analisi genomica, sono stati scoperti e studiati alcuni markers, specificamente coinvolti nella **motilità** e nella **capacitazione spermatica** e di conseguenza nella fertilità generale del soggetto ¹⁰.

1.3.1 Il gene Sam68

Gli studi che fanno riferimento a questo specifico gene sono quasi esclusivamente basati su prove in animali di laboratorio, i quali sono stati resi silenti al loco specifico del gene **Sam 68** (topi *knockout*) per vedere quali effetti si creano in assenza della proteina da esso codificata e confrontando infine i risultati con quelli provenienti da soggetti “normali” o meglio *wild-type*.

Questo gene e la proteina specifica che esso codifica, fanno parte della famiglia delle proteine **STAR**, acronimo che significa proteine che attivano la traduzione dei trascritti di

RNA; queste proteine a loro volta possono essere inserite nella famiglia delle RBPs (proteine che legano l'RNA) ²².

La funzione specifica di questo gene e soprattutto della proteina da esso codificata, riguarda la regolazione della traduzione dell'mRNA, effettuata grazie al legame di questa proteina con uno specifico dominio all'interno del trascritto; in questo modo avviene una regolazione temporale dell'espressione di un particolare trascritto, durante la maturazione spermatocitaria.

La famiglia delle **STAR** comprende geni e di conseguenza rispettive proteine, che sono stati studiati nei crostacei (*Artemia salina*), nei nematodi (*Caenorhabditiselegans*), negli insetti (*Drosophilamelanogaster*) e nei mammiferi, come già ricordato, soprattutto nel topo (*Musmusculus*).

Per quanto riguarda i mammiferi, oltre al gene **Sam68** di nostro interesse, si ricordano il **QUAKING (QKI)**, l'**SLM-1** e l'**SLM-2** (facenti parte della sottofamiglia del Sam68, *in umana* chiamati **T-STAR**) e l'**SF1**²³.

Le proteine codificate da questi geni si legano all'mRNA, per il controllo della sua trascrizione, grazie alla presenza nella loro struttura di particolari domini che permettono loro di legarsi alla suddetta molecola; sono caratterizzate infatti da un dominio molto lungo, di circa **200 amminoacidi**, indicato con l'acronimo **hnRNP KH** e da altri due domini nominati **NK** e **CK**, molto conservati tra i generi, di 80 e 30 aminoacidi rispettivamente ²³.

Sembra che questi geni, compreso il Sam68 di interesse, non siano solamente coinvolti nella **regolazione traduzionale degli mRNA target** ma abbiano anche una funzione di **trasmissione di segnali all'interno della cellula**.

1.3.1.1 Sam68: marker di fertilità

Anche per il gene **Sam68** esiste una ulteriore suddivisione, infatti ritroviamo una sottofamiglia composta dal gene codificante per il **Sam68** (*SRC-associated in mitosis*) e altri due geni con le rispettive proteine, che sono l'**SLM-1** e l'**SLM-2**; mentre il Sam68 lo si ritrova in tutte le cellule e gli apparati dell'organismo e risulta il più studiato, l'**SLM-1** e **2** li si ritrovano solamente in specifici organi e cellule^{22,24}.

La proteina codificata dal gene Sam68 ha molteplici ruoli, dimostrati in molti studi, che vanno dal controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi²⁵, al coinvolgimento nella crescita delle cellule tumorali prostatiche e delle ghiandole mammarie^{26,27}, al controllo sullo sviluppo delle cellule del sistema nervoso²⁸ e infine un controllo sullo sviluppo dell'organismo dal punto di vista metabolico e osseo²⁹.

Il trascritto proteico delle Sam68 risulta anche essere notevolmente modificato nelle fasi post-trascrizionali, da reazioni di acetilazione, metilazione e fosforilazione di *serina*, *treonina* o *tirosina* in risposta a particolari segnali o modificazioni all'interno della cellula²².

Della sottofamiglia Sam68 di cui si è accennato sopra, si prende ora in considerazione solo la **Sam68** che oltre ad essere la più studiata tra le suddette proteine, risulta essere anche direttamente coinvolta nella fertilità dei soggetti.

Questo gene e il suo trascritto, dagli studi eseguiti, in particolare di proteomica, è attivo durante particolari fasi della spermatogenesi e in particolare si ritrova elevata presenza della proteina da esso codificata nelle fasi che vanno dagli **spermatidi secondari** (tardo pachitene) fino agli **spermatidi rotondi**.

Per capire il ruolo che il gene Sam68 e il suo trascritto hanno nel controllo post-trascrizionale degli mRNA, sono stati effettuati studi su alcuni mRNA target, nello specifico 11, uno dei quali era sovra espresso e i rimanenti erano sotto espressi.

Grazie all'aggiunta di oligo d-T ai campioni, sono stati individuati gli mRNA con le loro estremità di *poly-A* e le proteine ad essi collegate, tra cui l'elevato legame con la Sam68, per alcuni di questi.

Per valutare infine la specificità di legame tra la proteina Sam68 e particolari mRNA, sono stati eseguiti studi di coimmunoprecipitazione e si è visto che solo particolari trascritti sono i targets della Sam68; tra i non targets rientra anche il trascritto per la *Prm2*, di cui si è parlato nel precedente capitolo³⁰.

Tra gli mRNA target, oggetto di studio, è stato preso in considerazione anche quello responsabile della produzione di una particolare proteina assonemmale, direttamente coinvolta nella motilità spermatica, la **SPAG16**³¹.

La suddetta proteina assonemmale, molto importante per la formazione di spermatozoi motili e quindi, fertili, viene espressa durante la **spermatogenesi** e l'inizio della **spermiogenesi**, due momenti in cui l'espressione del gene Sam68 risulta più attiva.

Da uno studio condotto, si è visto, grazie ad analisi di **RT-PCR**, che nei topi *knockout* che non esprimevano il gene Sam68, si aveva un grande accumulo di trascritti della proteina **SPAG16**, che non veniva quindi espressa; da qui si capisce come il gene Sam68 sia direttamente coinvolto nella sua espressione e come una sua deficienza causi problemi di fertilità.

1.3.2 Il gene LDHC

Il gene **LDHC** codifica per una specifica proteina enzimatica **testicolare**, la **LDH-C4**; l'enzima che viene a crearsi è un isoenzima, ossia una particolare variante molecolare enzimatica, che viene considerata come marker di buona o scarsa funzionalità cellulare ³².

1.3.2.1 I geni della famiglia LDH e le loro proteine

A causa di mutazioni geniche che si sono sviluppate nel tempo, da un ancestrale gene LDH si sono successivamente venuti a creare tre geni distinti, che si identificano con gli acronimi LDHA, LDHB e LDHC, che codificano tre distinte isoforme enzimatiche.

Le ricerche filogenetiche portano a considerare uno sviluppo dei geni LDHA e LDHB dalla duplicazione, durante l'evoluzione dei vertebrati, del gene ancestrale LDH ³³; il gene LDHC sembra invece provenire, sempre da analisi filogenetiche, dalla duplicazione del gene LDHB nei pesci e nei columbiformi e dalla duplicazione del gene LDHA, durante l'evoluzione dei mammiferi ³⁴.

Le isoforme enzimatiche codificate da questi geni si ritrovano nei tessuti in base alle caratteristiche metaboliche di quest'ultimi; infatti l'isoforma LDHA la si ritrova in quei tessuti caratterizzati anche da **metabolismo anaerobio**, situazione che ritroviamo nel muscolo scheletrico, che spesso lavora in debito di ossigeno, la isoforma LDHB la si ritrova invece molto più espressa nei tessuti con metabolismo strettamente aerobio, come il cuore.

L'isoforma LDHC la ritroviamo in sede **testicolare** e nello specifico **spermatocitaria**, in quanto proprio queste cellule sono caratterizzate da metabolismo glicolitico anaerobio, soprattutto in certe fasi della loro maturazione ³⁵; la localizzazione fisica dell'enzima è la **parte principale del flagello spermatico** e il **citoplasma**³⁶.

1.3.2.2 Controllo trascrizionale del gene LDHC

A livello testicolare, dove il gene **LDHC** si ritrova più espresso, abbiamo la presenza di 2844 molecole di trascritti su un milione di trascritto (Unigene Mn 16563) mentre la presenza dell'isoforma LDHA si attesta sulle 584 molecole di trascritti su un milione (Unigene Mn 29324)³².

Durante la spermatogenesi, l'isoenzima LDH-C4 è prodotto dalla fase di **tardo pachitene**, passando per la fase degli **spermatidi rotondi**, per concludersi con presenza a livello degli **spermatozoi**³⁷; inoltre il trascritto del gene LDHC, l'LDH-C4 è il più attivo negli spermatozoi ³⁵.

Il gene LDHC è controllato nella sua espressione a livello spermatico e ci sono tre zone geniche, con specifiche caratteristiche, che sono state di recente oggetto di studio per valutarne la loro reale funzione di regolazione e per valutare anche una loro implicazione nell'espressione tessuto-specifica del suddetto gene ³².

Queste regioni geniche sono rappresentate da una sequenza palindroma (**PA**) situata nella regione promotrice del gene, di 31-bp (bp: paia di basi) e in più, sempre nella regione promotrice del gene di 100-bp, si ritrovano regioni contenenti **GC box** e sequenze palindrome TGACG nominate **CRE** (fattore attivato dal cAMP).

In uno studio sul topo, grazie alla nuovissima tecnica dell'elettroporazione, si è visto che l'introduzione di sequenze transgeniche mutate della **PA**, non ha affatto influito sull'espressione dell'LDHC testicolare e in più questa sequenza non è coinvolta nella regolazione tessuto-specifica del gene.

Attraverso la medesima tecnica, si è visto da questo studio, che un **GC box** mutato ha causato una riduzione del 73% dell'attività genica, quindi il controllo da parte di questa regione, se non strettamente collegato al mantenimento di un livello basale di attività genica e di tessuto-specificità, comunque promuove l'attività genica.

Per quanto concerne invece la **CRE**, sembra, sempre dal medesimo studio, sia la più importante regione di regolazione e causa di tessuto specificità; infatti pare ci sia una stretta correlazione tra i livelli di FSH testicolari e il cAMP e di conseguenza l'azione delle CREM o delle CREB (proteine che si legano alla CRE per l'attivazione) grazie al loro attivatore ACT. Nelle fasi che precedono le cellule in pachitene, dove non viene rilevata presenza di ACT, pare sia coinvolto un altro fattore, l'FHL4³⁸.

1.3.2.3 Controllo traduzionale e mRNA

Pare sia presente anche un controllo post-trascrizionale per questo gene; uno studio ha dimostrato come la molecola del suo trascritto, presente in notevoli quantità nelle cellule germinali, sia resa molto stabile dalla presenza di lunghe code di *poly-A*³⁹; un altro studio dimostra come la stabilità di questa molecola potrebbe essere causata dalla presenza di sequenze AU all'estremità 3' non codificante (3'UTR)⁴⁰.

Potrebbe esserci un controllo epigenetico, dovuto alla presenza di RNA non codificanti, identificati come microRNA³².

Per valutare l'entità di espressione genica e la presenza di trascritti di mRNA per il gene in oggetto, uno studio ha usato dei topi *knockout* per il gene LDHC e li ha confrontati con topi *wild-type* e con genotipi eterozigoti.

I risultati ottenuti dagli estratti testicolari dei suddetti soggetti, riportano, per i topi *knockout*, livelli del trascritto, ottenuto mediante **real-time RT-PCR**, pari al 5.6% di quelli dei topi *wild-type* e per il genotipo eterozigote pari al 60% rispetto ai *wild-type*³⁶.

Un ulteriore studio ha invece valutato la quantità di trascritti per il gene LDHC, sempre su animali da laboratorio, nelle cellule spermatiche durante le varie fasi di sviluppo; si è visto dallo studio, che il trascritto del suddetto gene è completamente assente nelle fasi di spermatogonio A e B, per avere un elevato incremento a livello degli spermatociti in tardo pachitene e degli spermatidi rotondi; lo studio ha rivelato anche che la presenza del trascritto a livello di spermatidi in allungamento decresce di molto⁴¹.

1.3.2.4 Funzione dell'isoenzima LDH-C4 e conseguenze di una carenza

La funzione dell'enzima, grazie alla sua azione di conversione del **piruvato** in **lattato**, con la conseguente ossidazione/riduzione del NADH a NAD⁺, gioca un ruolo di primo piano nel metabolismo anaerobio caratteristico dello spermatozoo ⁴².

Uno studio recente ha cercato di saggiare i vari ruoli che l'LDH-C4 ha nel **metabolismo** delle cellule germinali e valutarne, grazie all'utilizzo di topi *knockout* per il gene LDHC, confrontati con topi *wild-type* ed eterozigoti, le conseguenze di una sua perdita o carenza; da questo studio emerge una riduzione dell'utilizzo del glucosio da parte dei soggetti *knockout* rispetto agli eterozigoti e ai *wild-type*, con una diminuzione dell'ATP disponibile, però non risultano esserci variazioni significative sulla fosforilazione ossidativa, sul rapporto NADH:NAD⁺ e inoltre le cellule germinali dei *knockout* sembrano essere in grado di utilizzare il glucosio; quindi dallo studio risulta una affezione alla glicolisi dove abbiamo carenza di espressione genica, mentre gli altri risultati discordanti possono essere spiegati con l'intervento di altre componenti enzimatiche affini (per esempio da parte dell'LDHA, sempre presente in piccole quantità nelle cellule germinali e responsabile di un 17.5% di attività), da differenze di cinetica tra le due isoforme e la considerazione dell'esistenza di fattori che potrebbero essere sufficienti, in misura minore a portare a termine il processo glicolitico ⁴³.

Per quanto concerne la **spermatogenesi**, da studi effettuati sempre sul topo, non ci sono evidenti variazioni della stessa, a conferma che il gene LDHC non è direttamente coinvolto nel processo ³⁶.

La **fertilità**, invece, è gravemente affetta, da studi sempre sul topo, con 1, massimo 3 cuccioli in soli due parti; nello studio sono stati accoppiati 11 topi *knockout* con 44 femmine *wild-type* ^{36,32}.

La **motilità** e la **capacitazione** sono gravemente affette; da studi eseguiti, la presenza del gene LDHC è essenziale per la fosforilazione della tirosina, meccanismo coinvolto nella capacitazione spermatica e i soggetti con deficit al gene non erano in grado di fertilizzare la cellula uovo e se ciò riusciva ad avvenire era solamente dovuto alla rimozione meccanica della zona pellucida (con un 29% di oociti fecondati) ⁴⁴.

La motilità, sempre dallo stesso studio, non sembrava all'inizio gravemente affetta ma con il passare del tempo i soggetti *knockout* mostravano una motilità progressiva

diminuita e una mancanza di iperattivazione della motilità, caratteristiche che non permettono alle cellule spermatiche di risalire le vie genitali femminili ³⁶.

1.3.3 Il gene SP22

1.3.3.1 La proteina SP22

Questo gene e la **proteina di membrana** da esso espressa, si ritrovano a livello delle cellule germinali, come dimostrato da studi sul topo, in umana e sul toro e nello specifico la proteina **SP22** si ritrova, nella maggior parte delle specie, topograficamente parlando, a livello del margine ventrale della linea equatoriale della testa della cellula spermatica⁴⁵.

Da uno studio recente sugli spermatozoi di stallone, si è visto come la maggior parte delle cellule spermatiche mostra un'elevata concentrazione della proteina SP22 all'apice della regione equatoriale e acrosomale^{46,47}; lo stesso studio ha dimostrato un'affinità tintoriale per la proteina SP22, negli spermatozoi ottenuti da prelievi autunnali e la spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che queste cellule si sono formate durante la fase di picco del periodo riproduttivo e hanno accumulato molta proteina rispetto a quelle estive, che si sono formate alla fine del periodo primaverile; ciò indirizza verso il ruolo di questo gene nella fertilità dei soggetti ⁴⁶.

Da uno studio sul topo, analisi di northernblotting, hanno rivelato la presenza di trascritti (mRNA) del gene SP22 a livello di vari organi, anche se la maggior quantità si ritrova a livello testicolare e inoltre si ritrova un trascritto di 1.5-kb, solo nel testicolo, che sembra coincidere inoltre con la formazione degli **spermatociti della fase di pachitene** e con gli **spermatidi rotondi**^{45,48}; anche nel testicolo di stallone si ritrova questo particolare trascritto di 1.5-kb e inoltre la coda dell'epididimo è quella più ricca in SP22 mRNA⁴⁹.

1.3.3.2 Alterazioni nell'espressione della SP22 e sua ipotetica funzione

Per valutare gli effetti di una mancata espressione della suddetta proteina, sono state utilizzate, per la conduzione di studi, delle sostanze chimiche che vanno ad inficiare sulla spermiogenesi, nel topo, nel coniglio e in umana.

Nello studio sul coniglio, l'esposizione spermatica all'acido dibromoacetico, ha ridotto l'espressione della SP22 e inoltre si è ridotta di molto la percentuale di concepimento ⁵⁰. Negli studi sui topi, in cui si è simulata l'esposizione spermatica agli acidi dibromoacetico e bromocloracetico, si è vista una diminuzione della fertilità dose-dipendente, saggiata con inseminazioni artificiali in utero in cui si valuta l'impianto embrionale al nono giorno, confrontato con il numero di corpi lutei presenti; negli stessi studi si è visto come la quantità di proteina fosse notevolmente diminuita, grazie all'utilizzo dell'elettroforesi su gel ^{51,52}.

La proteina SP22, anche per la sua localizzazione a livello spermatico, sembra, sia coinvolta **nell'interazione spermatozoo-zona pellucida**, in uno studio si è incubato un anticorpo anti-SP22 con lo sperma di ratto, 5 min prima che questo venisse impiegato nell'inseminazione artificiale delle femmine e si è vista una riduzione dose-dipendente della percentuale di fertilizzazione ⁴⁸.

Questo studio, svolto grazie all'utilizzo di anticorpi, precorre quello che potrebbe essere il futuro dell'uso di questo marker per la valutazione della fertilità sia in campo veterinario che umano ⁴⁸; inoltre il fatto che questa proteina sia largamente espressa e conservata tra le varie specie, farebbe pensare ad un suo ruolo molto importante nella fisiologia della riproduzione ⁴⁵.

Nello stallone, uno studio ha rivelato anche un'alterazione nella localizzazione della proteina SP22 nella cellula spermatica, a seguito del processo di congelamento del materiale seminale, la cui importanza biologica deve a tutt'oggi essere dimostrata e si potrebbe pensare ad una deficienza di protezione da parte dei plasma extenders utilizzati o dei crioprotettori⁴⁷.

2 Obiettivi dello studio

A livello clinico è già ampiamente verificato che i parametri di motilità sono condizione necessaria ma non sufficiente a garantire l'efficienza del materiale seminale e si cercano costantemente nuove metodiche analitiche che consentano di offrire garanzie sempre maggiori a livello commerciale.

Questo lavoro si propone di indagare se esistano, come già dimostrato in altre specie, marker genomici che possano integrare le valutazioni di routine sul materiale seminale equino e che ne consentano una valutazione sempre più oggettiva, standardizzata e completa.

Gli obiettivi del presente studio sono:

- Estrazione dell'RNA da spermatozoi adulti eiaculati;
- Quantificazione dei **livelli di trascritti** mediante real-time RT-PCR dei geni **Sam68**, **LDHC** e **SP22** che da precedenti studi in altre specie risultano correlati alla **motilità** e alla **capacitazione** spermatica;
- Dimostrare l'esistenza di una variabilità nell'espressione dei suddetti geni, in 11 stalloni adulti, in attività riproduttiva, precedentemente categorizzati;
- Stimare l'utilità di questi geni come **biomarkers di fertilità** negli stalloni.

3 Materiali e metodi

3.1 Prelievo del materiale seminale

Il materiale seminale è stato raccolto da 11 stalloni di razza Trotter (6/11) ed Holstein (5/11), in attività riproduttiva, di età compresa tra i 5 ed i 13 anni. La disponibilità è stata accordata da cinque centri stalloni del nord Italia. L'ejaculato è stato raccolto con salto su manichino mediante vagina artificiale modello Missouri, nel periodo aprile – luglio dell'anno 2013 e sono state effettuate 3 ripetizioni per ogni soggetto a distanza di 48 ore tra un prelievo ed il successivo.

I soggetti sono stati categorizzati in tre gruppi, rispettivamente dei **fertilissimi**, dei **mediamente fertili** e degli **ipofertili**; la percentuale di gravidanza, calcolata sulla media di tre stagioni riproduttive successive con termine il 30 di settembre, si attesta >70% per i fertilissimi, tra il 50 e il 70% per i mediamente fertili e <50% per gli ipofertili.

3.2 Analisi sul materiale seminale

Dopo essere stato prelevato, il seme è stato filtrato e mantenuto alla temperatura di 37°C mediante bagnomaria. Sono stati valutati i parametri di motilità mediante CASA, sia sul tal quale che dopo diluizione 1:4, entro 5 minuti dal prelievo. I campioni sono dunque stati divisi in 3 aliquote da 4 ml e conservati a -80°C fino allo svolgimento delle successive valutazioni

La temperatura di -80°C, garantisce l'inattivazione delle RNAasi, che andrebbero a lisare l'mRNA di interesse per lo studio⁵³.

3.3 Estrazione dell'mRNA

Per l'estrazione delle molecole di RNA totale dai campioni, si è partiti da una quantità di **2ml** di materiale spermatico, dopo averlo scongelato, lasciandolo a temperatura ambiente, sotto cappa biologica per almeno 10-15'. Il campione è stato trasferito in una provetta da centrifuga da 15 mL (BD Falcon) e centrifugato per 10' a 1500 rpm a temperatura ambiente, al fine di concentrare il materiale spermatico. Dopo l'eliminazione del

surnatante per mezzo di una pompa a vuoto, il campione concentrato è stato risospeso in 1 mL di D-PBS (EURO-CLONE). Il materiale seminale è stato quindi sottoposto ad un procedimento di purificazione: in una nuova provetta da 15 mL, a cui sono stati aggiunti 3 mL di EQUIPURE™ 40% Top Layer (Nidacom International AB, Mölndal, Sweden), preriscaldati a 37°C sui quali è stato delicatamente adagiato il campione. Il preparato è stato centrifugato per 30' a 1500 rpm a temperatura ambiente.

Questo trattamento permette di ottenere, a fine centrifugazione, tre strati separati all'interno della provetta; avremo sul fondo lo sperma puro, sopra la soluzione di EQUIPURE™ e nell'ultimo strato spermi immaturi, cellule somatiche e batteri ⁵³.

Si procede poi con l'eliminazione del surnatante, ed a un nuovo ciclo di centrifugazione per 10' a 3500 rpm e alla ulteriore rimozione del surnatante.

La preparazione dei campione procede con altri 2 lavaggi con 10 mL di D-PBS, eseguendo, tra un lavaggio e il successivo, centrifugazioni di 10' a 1500 rpm a temperatura ambiente.

La rottura delle cellule è stata effettuata mediante l'uso del TRIzol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), che permette di ottenere la massima quantità di RNA ottenibile dal campione in esame; si aggiunge quindi 1mL di reagente, conservato a 4°C, al composto e si lisano le cellule spipettando il campione per almeno venti o trenta volte.

Alla fine di questa fase molto delicata, per permettere una migliore azione del reagente, il campione viene messo in un bagnetto a 37°C per 30' vortexando ogni 5'.

Da questo momento, il passaggio successivo è quello dell' **estrazione dell'RNA** totale dal campione.

Al campione vengono aggiunti 200 µl di Cloroformio e viene vortexato per 15''; il campione viene successivamente lasciato a temperatura ambiente per 2-3'.

Si centrifuga poi il campione in stanza fredda, a 4°C, per 15' a 12000 rpm; alla fine della centrifugazione si otterranno **tre fasi distinte**, una fase, alla cima della provetta, limpida, in cui si ritrova l'RNA, una intermedia bianca e infine, sul fondo, una fase rossa di materiale organico. Viene ora prelevato il surnatante limpido ottenuto nella fase precedente, di circa 600 µl, e posto in una nuova provetta; ad esso vengono aggiunti 600 µl di Etanolo al 70% e il campione viene vortexato.

Vengono prelevati quindi 600 µl del preparato così ottenuto e trasferiti in una RNeasy Mini spin column, dotata di membrane, posta in una provetta da 2 mL; il preparato viene centrifugato per 15'' a 10000 rpm e l'eluato viene eliminato. Si ricarica quindi la colonnina con i restanti 600 µl di soluzione contenente l'RNA e si centrifuga come descritto sopra.

Si aggiungono ora al preparato, che si ritrova nella RNeasy Mini spin column, posta all'interno della provetta da 2 mL, 500 µl di Buffer RPE (RNeasy Lipid Tissue Mini Kit, Quiagen), precedentemente preparato con l'aggiunta di Etanolo 70%, per il lavaggio della membrana; il tutto viene centrifugato per 15'' a 10000 rpm e alla fine viene eliminato l'eluato.

Utilizzando sempre la medesima provetta, si aggiungono alla RNeasy column altri 500 µl di Buffer RPE e si centrifuga il tutto per 2' a 10000 rpm; questo passaggio garantisce un'asciugatura ottimale della membrana in cui si ritrova l'RNA e assicura l'asportazione di tutto l'Etanolo presente, che potrebbe interferire con le successive analisi; il fluido di fondo e la provetta vengono ora eliminati.

In una nuova provetta da 2 mL, si pone la RNeasy column ottenuta, e si centrifuga il tutto per 1', alla massima velocità, per evitare che possano essere presenti eventuali residui di reagenti utilizzati.

Alla fine della centrifugazione, si elimina la provetta e la RNeasy column viene posta in una nuova provetta da 2 mL e al preparato si aggiungono 30µl di RNase free-water; per permettere la separazione dell'RNA dalla membrana, si opera una centrifugazione per 1' a 10000 rpm; la stessa operazione viene eseguita una seconda volta, o aggiungendo il medesimo volume di RNase free-water o utilizzando l'mRNA ottenuto dal precedente lavaggio, se fosse necessaria una maggiore concentrazione dello stesso ⁵⁴.

3.4 Quantificazione dell'RNA estratto

Per la quantificazione dell'RNA è stato utilizzato uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (ThermoScientific, Wilmington, DE, USA); sono stati estratti dai campioni di seme, dai 500 ai 1500 ng di RNA.

3.5 La RT-PCR

Con l'acronimo RT-PCR si intende “reazione a catena della polimerasi con retrotrascrizione”, ossia a partire da una molecola di mRNA, estratto seguendo il precedente protocollo descritto, si mira all'ottenimento di una molecola a doppia elica di cDNA o molecola di DNA complementare all'mRNA.

Il Kit utilizzato in laboratorio è della Invitrogen™ che utilizza un enzima, per la creazione del cDNA, isolato da *Escherichia coli*, che esprime a livello plasmidico una porzione del gene *pol* della *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT)^{55,56}. I componenti del kit sono l'enzima M-MLV RT, 5X First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCL, 375 mM KCL, 15 mM MgCl₂) e 0.1 M di DTT; il kit viene conservato a -20°C.

Per un volume totale di reazione di 20µL si utilizzano o 1 ng-5 µg di RNA totale oppure 1-500 ng di mRNA.

Si utilizza un tubino da 200 uL nucleasi-free (per non danneggiare le molecole di RNA) e si mescolano:

- 1 µL di Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500µg/mL), che si lega alle code di *poly-A* che caratterizzano la molecola di mRNA;
- 185 ng di RNA totale precedentemente estratto;
- 1 µL di dNTP Mix (Kit Invitrogen™) 10 mM;
- H₂O distillata nucleasi-free fino al volume di 12µL;

Questo preparato viene riscaldato, a 65°C, in un termo-ciclatore BIOER (LifePro(48/96/384/G)) per 5' e infine trasferito velocemente in ghiaccio.

Il preparato viene centrifugato brevemente per raccogliere tutto il composto sul fondo del tubino e successivamente si aggiungono:

- 4 µL di 5X First-Strand Buffer;
- 2 µL di DTT 0.1 M, che rende lineari le molecole di RNA, che tenderebbero a formare strutture ad ansa o “loop” ;
- 1 µL di RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen™) (40 U/µL);

La mix così preparata viene delicatamente mescolata, con attenzione in quanto la molecola di RNA è molto instabile e incubata a 37°C per 2', sempre nel termo-ciclatore.

Si procede poi con l'aggiunta di 1µL di M-MLV RT (200 U/µL) e si mescola, spipettando con delicatezza.

A questo punto si procede con l'incubazione a 37°C per 50'. La reazione enzimatica viene inattivata incubando a 70°C per 15 min.

A conclusione del processo, si può utilizzare il **cDNA** ottenuto per il successivo passaggio ⁵⁷.

3.7 La real-time PCR

La real-time PCR è il processo mediante il quale il cDNA, ottenuto nella precedente lavorazione, viene amplificato grazie alla reazione a catena della polimerasi e specificamente quantificato; grazie all'utilizzo di *sequenze primer* specifiche per i geni LDHC, Sam68 ed SP22, si andranno ad amplificare, all'interno delle molecole di cDNA ottenute, solo le regioni di nostro interesse e quindi si quantificherà l'espressione genica delle stesse.

La real-time PCR è stata eseguita con l'uso del kit FastStart SYBR Green Master dell'azienda ROCHE; il kit è pronto all'uso e contiene la totalità dei reagenti necessari, eccettuate le sequenze primer specifiche e il cDNA; il kit viene conservato ad una temperatura di -15°C fino a -25°C e lontano da fonti di luce.

Si inizia l'ultima fase di processazione del campione, utilizzando un tubino da 100 µL in cui si prepara una mix per avere un volume finale di reazione pari a 15 µL e si aggiungono nell'ordine:

- 7.50µL di FastStart SYBR Green Master (2X); il colorante fluorescente SYBR Green in esso contenuto si lega alle doppie eliche di amplificato di cDNA iniziale e fornirà alla macchina di lettura un segnale, tanto più intenso, quanto maggiore sarà l'espressione dei geni in esame;
- 0.45µL di Primer FOR (10 µM) ad una concentrazione finale di 300 nM;
- 0.45 µL di Primer REV (10 µM) ad una concentrazione finale di 300 nM;
- 5.10 µL di H₂O RNase-DNasefree (GIBCO);

Al termine si avrà, per questa mix, un volume finale di 13.5 µL.

Prima dell'aggiunta del cDNA, ottenuto precedentemente, si mescola delicatamente la mix e la si spinna.

Si aggiungono infine 1.5 μ L di cDNA (alle opportune diluizioni) e si mescola il preparato con delicatezza ⁵⁸.

Il **CICLO DI PCR** viene così a strutturarsi⁵⁸:

- 1 ciclo di holding alla temperatura di 95°C per 10', che serve per attivare la DNA polimerasi contenuta nella Master Mix;
- 40 cicli così suddivisi:
 - i) denaturazione alla temperatura di 95°C per 15'';
 - ii) fase di annealing alla temperatura di 60°C per 20'';
 - iii) fase di allungamento alla temperatura di 72°C per 30'';
- 1 ciclo di melting;
- a partire da una temperatura di 65°C fino ai 95°C con innalzamenti di 1°C ogni 5''; questo passaggio serve per valutare la presenza di eventuali amplificati aspecifici .

Primers utilizzati per la valutazione dell'espressione genica:

Gene	primer FOR (5' → 3')	primer REV (5' → 3')	Lunghezza amplificato
LDHC	CAATCATTCCTGCCATAGTCCA	ACCCACTTAGCTTCCAGACC	102
SP22	GCTGTCATACTACCCATGTCCG	AGGGTGGACGACATAGCTG	94
SAM68	TGCACTCCATGAAAAGCTCA	TTCGTCCAGCTGCAGTG	152
Actin- beta (HK)	CTCCCAGCACGATGAAGA	GTACTCCTGCTTGCTGATCC	125
Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (HK)	CACCAATCACCCAGCAAGAG	GGTCTGAGATGGAAACTGTGG	116

Tabella I. Elenco dei primers utilizzati per la valutazione dell'espressione dei geni LDHC, Sam68 ed SP22; con l'acronimo HK si intende identificare i geni housekeeping.

4 Risultati

Stallone	Concmil /ml	%mot	%pms
1	291	73	52
2	405	93	55
3	172	88	85
4	236	91	80
5	360	84	38
6	265	74	28
7	310	95	42
8	183	61	19
9	210	36	18
10	197	64	21
11	244	56	23

Tabella II. Valori di concentrazione, motilità e motilità progressiva degli stalloni esaminati; i dati si intendono come media dei valori di n.3 prelievi.

Per conseguire questi risultati, tutti i dati ottenuti sono stati normalizzati nei confronti dei geni HK (geni housekeeping), ossia geni che sono costitutivamente espressi in tutte le cellule di un organismo, sia che esse si ritrovino in uno stato fisiologico che patologico; inoltre, per una migliore interpretazione dei grafici, gli istogrammi partono dal valore di espressione 1, così la visualizzazione di un risultato negativo appare più chiara al lettore.

Il gruppo dei **fertilissimi** è stato scelto come riferimento verso il quale misurare le espressioni geniche degli altri due gruppi, ossia quello degli **ipofertili** e dei **mediamente fertili**; inoltre è stato scelto come valore soglia per la sovra espressione del gene il valore **2**, rappresentato nei grafici in ordinata e come valore soglia per la sotto espressione del gene, il valore di **0.5**, sempre in ordinata, nei grafici rappresentati.

4.1 Espressione del gene Sam68

Dall'analisi di real-time RT-PCR, effettuata sugli 11 campioni di sperma di stalloni categorizzati, come precedentemente descritto, emerge chiaramente una presenza importante di trascritto nei campioni di materiale seminale dei soggetti categorizzati come ipofertili e, al contrario, una diminuzione dello stesso a livello delle categorie dei soggetti mediamente fertili e fertilissimi (Grafico 1).

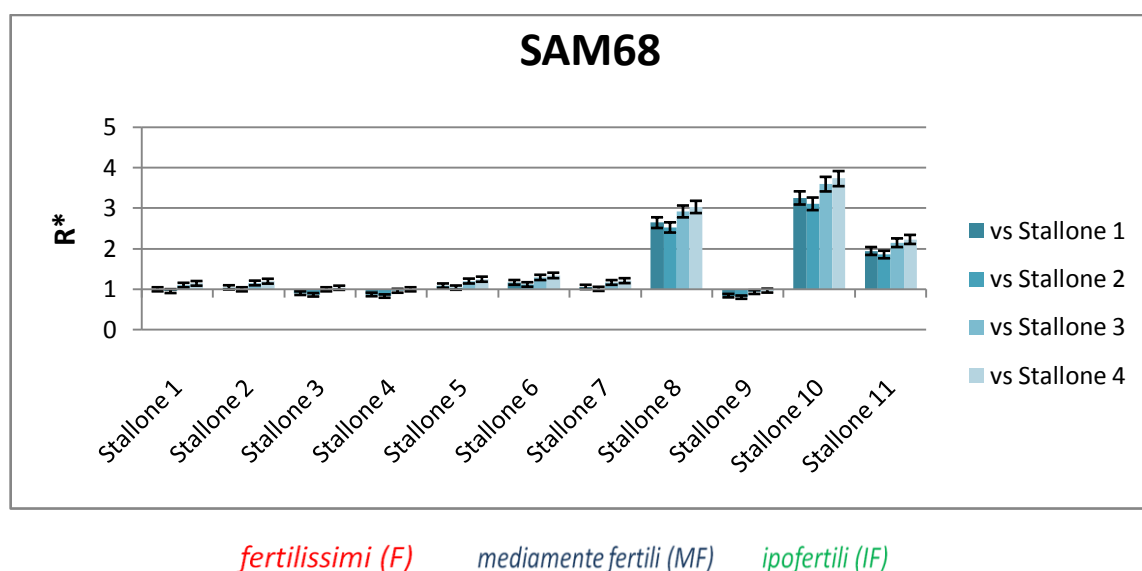


Grafico 1. Espressione del gene Sam68 nei soggetti studiati;

R^* indica quante volte il gene SAM68 è espresso nel seme di stallone mediamente fertile o ipofertile rispetto al seme di stallone fertilissimo

$R^* = \text{media di } [(\text{espressione gene target/ geni HK in seme MF o IF}) / (\text{espressione gene target/ geni HK in seme F})]$

Nello specifico si denota una **sovra espressione**, in media, del gene in oggetto, nello stallone 8, 10 e 11 del gruppo degli **ipofertili** rispetto ai fertilissimi; si evince una espressione discreta, in media, nei soggetti 5, 6 e 7 del gruppo dei mediamente fertili e una espressione bassa, in media e senza essere sottoespressa, nel gruppo dei soggetti fertilissimi.

Si è infine valutata la correlazione tra l'espressione del gene in oggetto e la motilità progressiva espressa dai vari gruppi di stalloni considerati; per il gruppo dei fertilissimi questa è negativa (-0.911), per il gruppo dei mediamente fertili si presenta negativa (-0.999) e per il gruppo degli ipofertili leggermente positiva (0.375) (Tabella V).

		SAM68/media				
SAM68		HK	vs St.1	vs St.2	vs St.3	vs St.4
<i>fertilissimi</i> % grav. > 70	Stallone 1	1,05	1,10	1,15	0,92	0,85
	Stallone 2	1,09	1,16	1,20	0,96	0,89
	Stallone 3	0,95	1,00	1,04	0,83	0,77
	Stallone 4	0,91	0,96	1,00	0,80	0,75
<i>mediamente fertili</i> % grav. 50-70	Stallone 5	1,14	1,20	1,25	1,00	0,93
	Stallone 6	1,22	1,29	1,34	1,07	1,00
	Stallone 7	1,11	1,17	1,21	0,97	0,90
<i>ipofertili</i> % grav. < 50	Stallone 8	2,77	2,92	3,03	2,43	2,26
	Stallone 9	0,88	0,93	0,97	0,77	0,72
	Stallone 10	3,40	3,60	3,73	2,99	2,78
	Stallone 11	2,03	2,15	2,23	1,79	1,66

Tabella V. Valori di espressione del gene Sam68 nei gruppi considerati.

Il gene Sam68, come precedentemente visto da studi in animali da laboratorio²², è espresso negli stadi immaturi delle cellule della linea germinale a livello degli **spermatidi secondari** in tardo pachitene e negli **spermatidi rotondi**. Questa particolare localizzazione per l'espressione genica è stata valutata anche nello studio del 2005 di Paronetto, dove si sono prelevati estratti testicolari in varie fasi di sviluppo e si sono eseguite prove di Northernblot, evidenziando un netto calo di trascritto con la maturazione testicolare⁵⁹.

Il risultato del nostro studio suggerisce che analogo meccanismo si verifichi anche negli spermatozoi di stallone, considerando che i soggetti fertilissimi e i mediamente fertili dimostrano una presenza molto limitata e in alcuni casi appena accennata del trascritto, al contrario dei soggetti ipofertili. Si può quindi ipotizzare che a dispetto di una morfologia fisiologica gli spermatozoi di soggetti con problemi di fertilità possano aver subito un processo di arresto della maturazione o un'alterazione della stessa che ha impedito o rallentato il blocco trascrizionale del gene Sam68.

In riferimento al dato di correlazione con la motilità progressiva dei soggetti, la **correlazione negativa** che si presenta nel gruppo dei fertilissimi fa pensare al ruolo che la proteina Sam68 ha nel controllo trascrizionale di alcuni mRNA durante la spermatogenesi; in particolare quello della SPAG16L, la cui deficienza porta a deficit di motilità³¹.

4.2 Espressione del gene LDHC

L'esame di real-time RT-PCR, operato sui campioni in esame, per il gene LDHC, dimostra (Grafico 2), rispetto alla situazione che si presenta negli altri due geni, una maggiore variabilità soggettiva intragruppo; in particolare per il gruppo dei soggetti mediamente fertili, che comunque sono animali che mantengono buone performance riproduttive, si potrebbe pensare ad una condizione di **eterozigosi** al *locus* del gene ³⁶.

La correlazione leggermente positiva con la motilità, che vediamo in questo gruppo, sostiene anch'essa questa posizione, ossia che ci sia un gene funzionante, ma solo alla metà delle sue reali capacità.

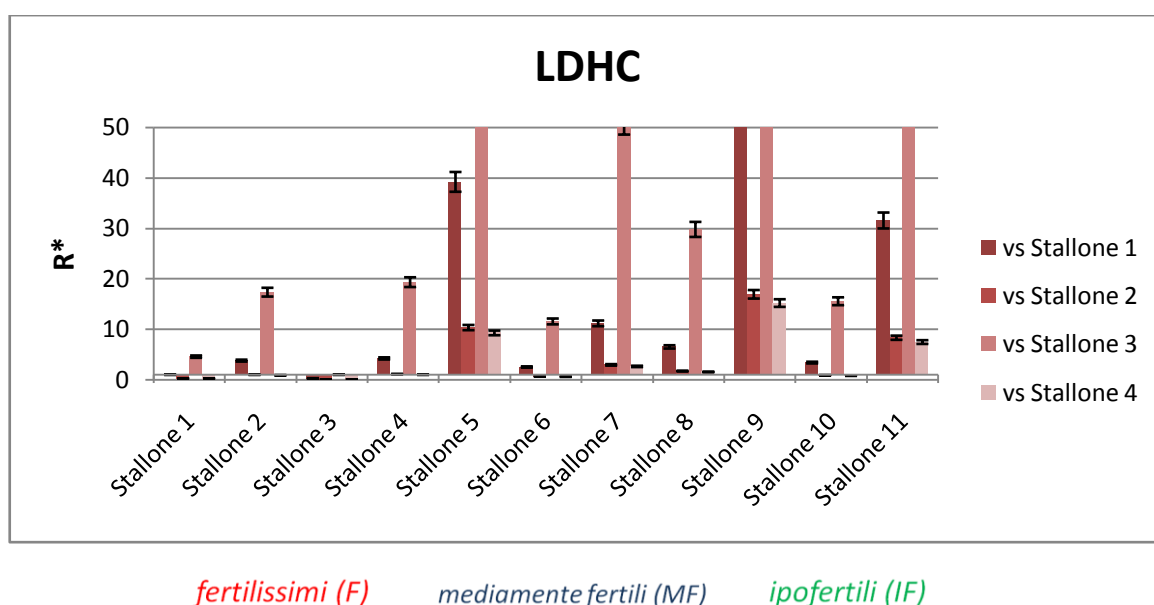


Grafico 2. Espressione del gene LDHC nei soggetti studiati;

R^* indica quante volte il gene LDHC è espresso nel seme di stallone mediamente fertile o ipofertile rispetto al seme di stallone fertilissimo

$$R^* = \text{media di } [(\text{espressione gene target/ geni HK in seme MF o IF}) / (\text{espressione gene target/ geni HK in seme F})]$$

Tutti i **soggetti ipofertili** hanno una sovra espressione del gene in oggetto e in particolare lo stallone 9 dimostra notevole sovra espressione (97.49), rispetto al gruppo dei fertilissimi (Tabella III).

Lo stallone 11 ed i soggetti 8 e 10, risultano comunque sovra espressi, rispettivamente di 9.89 e 5.16 volte in più, in media, nei confronti dei fertilissimi.

Per il gruppo dei **soggetti mediamente fertili** la situazione è, per tutti e tre gli stalloni, di sovra espressione del gene in oggetto; lo stallone 5 si caratterizza, in media, di notevole sovra espressione e il suo comportamento lo si potrebbe rapportare a quello dello stallone 11, del gruppo degli ipofertili (Tabella III).

All'interno del gruppo dei **fertilissimi**, nella media di gruppo, il gene è sovra espresso; nello specifico abbiamo sovra espressione dello stesso nello stallone 2 e nel 4, con un livello di sovra espressione molto simile tra i due soggetti in esame; lo stallone 3 risulta sotto esprimere il gene LDHC, mentre lo stallone 1 lo esprime normalmente, senza sovra o sotto esprimerlo (Tabella III).

	LDHC	LDH/media HK	vs St.1	vs St.2	vs St.3	vs St4
fertilissimi % grav. > 70	Stallone 1	0,00	4,58	0,24	0,03	0,40
	Stallone 2	0,01	17,35	0,90	0,10	1,50
	Stallone 3	0,00	1,00	0,05	0,01	0,09
	Stallone 4	0,01	19,33	1,00	0,11	1,67
mediamente fertili % grav. 50-70	Stallone 5	0,10	179,35	9,28	1,00	15,53
	Stallone 6	0,01	11,55	0,60	0,06	1,00
	Stallone 7	0,03	51,12	2,64	0,29	4,43
ipofertili % grav. < 50	Stallone 8	0,02	29,78	1,54	0,17	2,58
	Stallone 9	0,16	293,67	15,19	1,64	25,42
	Stallone 10	0,01	15,55	0,80	0,09	1,35
	Stallone 11	0,08	144,36	7,47	0,80	12,50

Tabella III. Valori di espressione del gene LDHC nei gruppi considerati.

Dalla correlazione tra l'espressione genica degli stalloni considerati e la loro motilità progressiva, per il gruppo degli stalloni categorizzati come fertilissimi questa risulta essere negativa, pari a -0.107; per il gruppo dei mediamente fertili il dato si presenta leggermente positivo (0.452) mentre leggermente negativo quello dei soggetti ipofertili (-0.337).

Come precedentemente ricordato, il gene LDHC codifica per una variante isoenzimatica testicolare, l'LDH-C4, che è considerato, da bibliografia, un ipotetico marker futuro per una corretta funzionalità cellulare;

Il risultato riguardante la quantità di mRNA che è stato rilevato a livello dei campioni considerati nel presente studio, conferma quanto emerso da uno studio su animali da laboratorio, che dimostrava come la quantità di trascritto fosse notevolmente diminuita

nelle cellule in fase di elongazione ⁴¹. Nei soggetti fertilissimi, tranne in due casi, abbiamo un'espressione molto limitata del trascritto, come ci aspetteremmo da bibliografia e comunque l'entità di sovra espressione presente negli altri due fertilissimi non raggiunge mai i livelli di espressione delle altre categorie.

Lo studio riguardante gli estratti testicolari di animali di laboratorio, citato precedentemente, spiega anch'esso questo risultato, in quanto l'80% circa delle cellule del testicolo adulto si trovano nella **fase post meiotica**, quindi con moltissimi spermatidi rotondi, cellule in cui la quantità di trascritto è elevata, per diminuire nelle fasi più mature³⁶.

Tra le molteplici funzioni di questo gene, si ritrova un suo ruolo molto importante nella **fertilità** e il risultato ottenuto dal presente studio, in cui si denota una elevata presenza di trascritto nei soggetti ipofertili e nei mediamente fertili, che presentano basse percentuali di gravidanza, potrebbe collegarsi al risultato di una non corretta funzionalità del gene ^{36,32}.

La **capacitazione spermatica**, come precedentemente visto, è altamente collegata alla funzionalità di questo gene. La notevole quantità di trascritto presente a livello dei soggetti categorizzati con basse o intermedie percentuali di gravidanza farebbe pensare ad una mancata funzionalità genica, con un calo seguente della proteina LDH-C4, collegata al processo di capacitazione⁴⁴; inoltre i trascritti presenti a livello di questi spermatozoi adulti potrebbero trovarsi in notevole quantità nei campioni dei soggetti ipofertili e mediamente fertili, per una deficienza a livello della lunghezza delle code di *poly-A* dei trascritti, importanti per la loro corretta traduzione ⁶⁰.

La **motilità** è altamente controllata da questo gene, infatti abbiamo la presenza di una correlazione negativa tra la sua espressione nelle fasi testicolari adulte e la motilità progressiva, identificabile anche nei soggetti mediamente e ipofertili del presente studio. Il lavoro di Odet e coll. del 2008 sostiene il ruolo specifico che la proteina LDHC ha nei confronti della motilità, con una ricerca su topi di laboratorio *knockout* dove la condizione di eterozigosi è risultata associata a deficit nel controllo trascrizionale del gene in oggetto o alla mancanza di trascritti attivi.

Le tre situazioni, sommate, potrebbero spiegare i risultati ottenuti su questi due gruppi. ^{36, 61,41}.

4.3 Espressione del gene SP22

All'esame di real-time RT-PCR per la valutazione dell'espressione del gene SP22 nei soggetti categorizzati, appare evidente, alla prima valutazione del grafico (Grafico 3), come i soggetti identificati nelle categorie degli ipofertili e mediamente fertili non presentino espressione del trascritto a livello degli spermatozoi adulti; il comportamento appare differente per i soggetti fertilissimi.

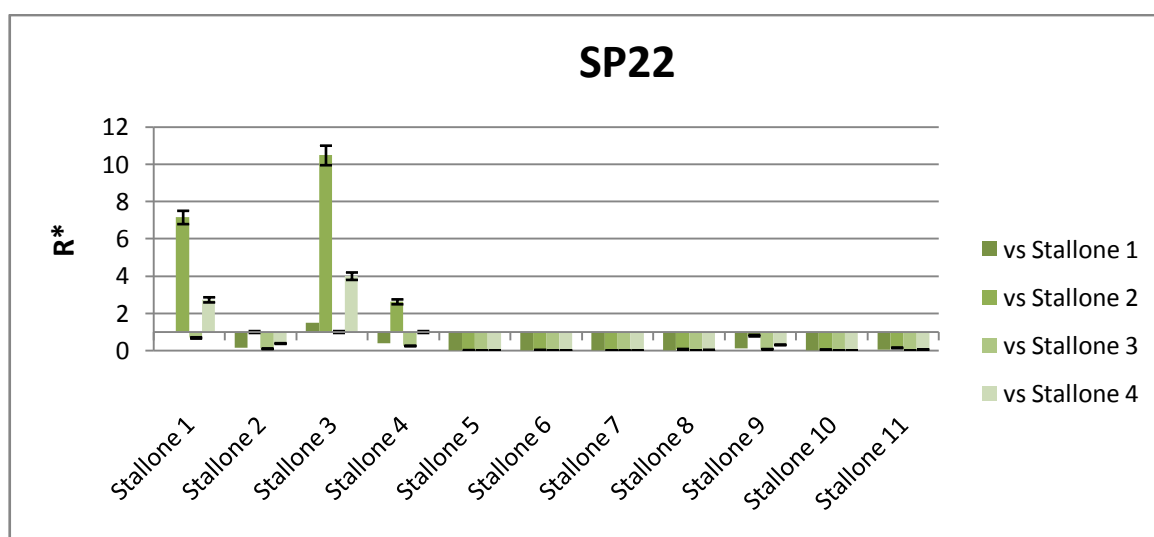
Analizzando i dati nello specifico, si vede, per il gruppo degli **ipofertili**, una sottoespressione, nella media di espressione del gruppo, del suddetto trascritto; in media, soprattutto per gli stalloni 8, 10 e 11, appare evidente una sotto espressione, mentre per lo stallone 9, sempre in media, si ha una espressione meno marcata (0.33) (Tabella IV).

Per il gruppo di soggetti **mediamente fertili**, si ha una sotto espressione del gene notevole, nella media del gruppo dei soggetti presi in considerazione; nello specifico tutti e tre gli stalloni presentano sottoespressione molto accentuata (Tabella IV).

Il gruppo dei soggetti **fertilissimi** si comporta all'opposto dei precedenti due gruppi, infatti, nella media di espressione del gruppo, il gene appare, di poco, sovra espresso (2.03); analizzando nello specifico i quattro soggetti, si vede come, in media, lo stallone 3 risulti molto sovra espresso (4.24) e anche lo stallone 1 risulta, non di molto sopra la soglia fissata, sovra espresso (2.89); lo stallone 4 risulta normalmente espresso e lo stallone 2 leggermente sottoespresso, rispetto al valore soglia (0.40) (Tabella IV).

	SP22	SP22/media HK	vs St.1	vs St.2	vs St.3	vs St.4
fertilissimi % grav. > 70	Stallone 1	5,65	0,68	2,73	327,04	247,85
	Stallone 2	0,79	0,10	0,38	45,70	34,64
	Stallone 3	8,28	1,00	4,00	479,37	363,30
	Stallone 4	2,07	0,25	1,00	119,84	90,82
mediamente fertili % grav. 50-70	Stallone 5	0,02	0,00	0,01	1,00	0,76
	Stallone 6	0,02	0,00	0,01	1,32	1,00
	Stallone 7	0,01	0,00	0,00	0,52	0,40
ipofertili % grav. < 50	Stallone 8	0,06	0,01	0,03	3,63	2,75
	Stallone 9	0,64	0,08	0,31	36,76	27,86
	Stallone 10	0,03	0,00	0,02	1,88	1,42
	Stallone 11	0,12	0,01	0,06	6,71	5,09

Tabella IV. Valori di espressione del gene SP22 nei gruppi considerati.



fertilissimi (F) *mediamente fertili (MF)* *ipofertili (IF)*

Grafico 3. Espressione del gene SP22 nei soggetti studiati;

R* indica quante volte il gene SP22 è espresso nel seme di stallone mediamente fertile o ipofertile rispetto al seme di stallone fertilissimo

$$R^* = \text{media di } [(\text{espressione gene target/ geni HK in seme MF o IF}) / (\text{espressione gene target/ geni HK in seme F})]$$

Per quanto riguarda la correlazione tra l'espressione genica e la motilità, per il gruppo dei fertilissimi, essa si presenta leggermente positiva, di valore pari a 0.375, per il gruppo dei mediamente fertili si presenta negativa (-0.937) e per il gruppo dei soggetti ipofertili, ancora negativa (-0.615).

Dagli studi effettuati su varie specie di mammiferi, il gene SP22, sembra essere coinvolto nel processo di interazione tra la zona pellucida dell'ovocita e la cellula spermatica⁴⁸.

Gli studi effettuati hanno dimostrato il ruolo molto importante che questa proteina ha nei confronti della fertilità^{51,52}, però i nostri risultati contrastano con quanto ottenuto dagli studi che hanno valutato la quantità di trascritto a livello di testicoli di animali da laboratorio a differenti stadi di età e in particolare i nostri dati contrastano con uno studio in cui si è dimostrata la totale assenza di trascritto a livello di cellule spermatiche in fase di elongazione⁶².

In un unico studio, di Miller e coll. del 2006, sono state svolte delle prove di northern blotting su testicoli ed epididimi di stalloni sottoposti a castrazione di routine, in cui si sono registrate presenze di trascritto⁴⁹.

Si ritiene siano però necessari ulteriori studi di genomica sullo spermatozoo in associazione a studi di proteomica, affinché questo possa essere confermato.

5 Discussione

Alla luce dei dati ottenuti dalle analisi di real-time RT-PCR, sui campioni di eiaculato provenienti da stalloni precedentemente categorizzati, in relazione all'espressione genica dei tre geni **LDHC**, **Sam68** ed **SP22**, è possibile fare alcune considerazioni importanti.

Esaminando la situazione che si è rivelata dalle analisi effettuate sul seme degli stalloni considerati, in riferimento in particolare al **gene Sam68**, ci si sofferma sulla sovra espressione di quest'ultimo nel gruppo degli stalloni ipofertili.

La bibliografia riguardante la presenza del trascritto del gene Sam68, riporta prove di analisi di Northern blotting, su estratti testicolari di animali da laboratorio, in varie fasi di età e quindi di maturazione cellulare testicolare; da questi studi emerge una netta diminuzione del trascritto più il testicolo va verso la maturazione e così anche le sue cellule ⁵⁹.

Questa situazione si presenta anche per i soggetti fertilissimi e mediamente fertili del presente studio, tutti in età adulta e in spermatozoi eiaculati e quindi presumibilmente maturi. Gli studi effettuati sugli estratti testicolari rappresentano comunque una solida conferma che i campioni dei gruppi sopra menzionati rispettino la fisiologica espressione del gene, in quanto un testicolo nella fase matura contiene circa l'80% di cellule in fase post meiotica, la maggior parte delle quali sono spermatidi rotondi e cellule in fase di elongazione e sicuramente cellule più adulte, che possono essere equiparate a quelle del presente studio per contenuto nucleare e citoplasmatico.

In quest'ottica il presente studio offre una prima valutazione del trascritto del gene Sam68 a livello delle cellule spermatiche presenti nell'eiaculato.

La situazione che si presenta nel gruppo degli ipofertili è quella di una sovra espressione del gene in oggetto e inoltre in questo gruppo, che ha una percentuale di gravidanza alquanto bassa, si ha anche una correlazione negativa tra l'espressione del gene e la motilità progressiva, considerando solo i soggetti della categoria che sovra esprimono il gene a questo livello.

Questi soggetti infatti hanno una motilità progressiva media molto bassa rispetto alle altre categorie e ciò potrebbe essere spiegato con una mancata azione della proteina assonemmale SPAG16, la cui traduzione è regolata dalla proteina Sam68 ³¹.

La presenza di elevato trascritto in cellule adulte come quelle considerate, può far riflettere sulla mancata traduzione dello stesso nelle fasi post-trascrizionali, come ipotizzato in uno studio sulla presenza di trascritti di protammine in cellule germinali adulte ⁶³.

La situazione che si rivela riguardo il **gene LDHC** è molto particolare nei campioni saggiati con il presente studio, in quanto anche da visualizzazione grafica si vede come ci siano molti picchi di sovra espressione a livello dei soggetti ipofertili e mediamente fertili e comunque espressione a livello dei fertilissimi.

I soggetti categorizzati come fertilissimi, quindi con elevata percentuale di gravidanza, rispecchiano molto bene, tranne in due casi di sovra espressione che comunque non raggiunge i picchi delle altre categorie, quella che è la normale fisiologia di espressione genica a livello di queste cellule; lo ricorda lo studio su cellule da animali da laboratorio, in cui è evidente un decremento dei livelli di trascritto più si procede con la maturazione cellulare ⁴¹.

Se noi consideriamo la correlazione esistente tra l'espressione genica e la motilità progressiva di questo gruppo, nella media dei due soggetti che non sovra esprimono il gene, si vede come il dato risulti negativo, ossia all'aumentare dell'espressione in queste cellule adulte, cala la motilità; infatti la situazione non fisiologica che si ritrova nei gruppi dei mediamente fertili e ipofertili vede cellule con motilità progressive molto inferiori a quelle presenti negli altri gruppi.

Da studi svolti si è visto infatti quanto questo gene sia coinvolto nella motilità e in questo specifico caso è quanto mai corretto riferirsi proprio alla motilità progressiva, che sembra controllata dalla presenza del trascritto isoenzimatico del gene **LDHC** ³⁶.

L'elevata presenza del trascritto nella categoria dei soggetti ipofertili, potrebbe portare alla considerazione dell'esistenza di trascritti con corte code di *poly-A*, quindi non funzionali, con il risultato ottenuto di sovra espressione per la suddetta categoria; uno studio ha infatti valutato la funzionalità dell'mRNA in vitro, utilizzando reticolociti di coniglio e si è visto che solo la presenza di mRNA con lunghe code di *poly-A* è trascrizionalmente attivo, quindi associato ai polisomi ^{61,41}.

Si potrebbe anche presupporre una mancata regolazione post-trascrizionale, presente anche per il gene **LDHC**; in uno studio, infatti, si dimostra come la quantità di trascritto

attivo, preceda, su saggi testicolari, la presenza dell'isoenzima di qualche giorno, facendo quindi pensare ad una regolazione post-trascrizionale⁶¹.

La presenza di trascritti a livello del gruppo dei mediamente fertili, probabilmente potrebbe indicare o la presenza di una trascrizione attiva anche nelle fasi post meiotiche⁶¹ o la presenza di una buona attività (pari al 17.5%) dell'isoenzima LDH-A, che comunque supplisce la carenza dell'LDH-C, soprattutto nel metabolismo spermatico⁴³.

I risultati ottenuti per l'espressione del **gene SP22** sono molto particolari e contrastanti con uno studio che vede la quantità di trascritto calare nelle tarde fasi spermatiche, partendo da estratti testicolari di varie specie, compreso l'uomo e il topo; lo stesso studio, grazie alla combinazione di studi di genomica, appunto valutando la quantità di trascritti di mRNA presenti e di proteomica, ha spiegato il calo di trascritto nelle tarde fasi cellulari con una maggiore attività traduzionale delle cellule dopo il blocco completo della trascrizione; nel presente studio i campioni delle categorie più svantaggiate sembrerebbero comportarsi in modo conforme agli animali da laboratorio, mentre i fertilissimi non hanno l'andamento atteso⁶².

La proteina sembra, ma molti studi sono ancora da effettuarsi, abbia un ruolo nell'interazione spermatozoo-zona pellucida e quindi molto importante sembrerebbe il suo ruolo nella fertilità dei soggetti; la cosa più particolare è che i gruppi meno fertili hanno pattern di espressione conforme alle altre specie studiate⁴⁸.

Per cercare di capire questa situazione, si deve partire dal presupposto che si sta studiando una cellula germinale adulta, cellula che dopo l'avvento degli spermatidi rotondi, non ha più attività trascrizionale e quindi dovremmo aspettarci che i trascritti che si sono formati nelle fasi precedenti al suddetto blocco restino stoccati fino agli stadi di tardo pachitene e di spermatidi rotondi, momento nel quale sono resi trascrizionalmente attivi nella sintesi proteica, infatti in questo momento si rinviene nelle cellule la massima quantità di trascritti e di proteine⁴⁸.

Si potrebbe dunque presupporre, nello specifico caso del gruppo dei fertilissimi, che in realtà non ci sia un blocco completo della trascrizione nelle fasi più mature della linea germinale; questo potrebbe essere spiegato facendo riferimento ad alcuni studi, riportati in una review, che riportano un'attività trascrizionale a carico dei mitocondri, valutata eseguendo saggi su teste spermatiche e code⁶⁰; si potrebbe fare riferimento anche all'incompleta sostituzione degli istoni con le protammine, durante il riarrangiamento

della cromatina ⁶; questo ci potrebbe far pensare all'esistenza di aree di genoma attive nell'attività trascrizionale.

Le dissertazioni fatte possono essere adattate anche alle situazioni viste per l'espressione genica degli altri due geni, in cui nei soggetti fertilissimi si ha comunque, anche se minima, un'espressione; essendo questa presente in soggetti "sani" dal punto di vista riproduttivo, le considerazioni fatte sopra possono ragionevolmente essere prese in considerazione fermo restando che purtroppo non vi sono ancora altri studi riguardanti lo stallone con cui confrontarsi .

6 Conclusioni

L'estrazione di RNA da spermatozoi eiaculati è stata possibile in tutti i campioni oggetto dello studio e la conservazione a -80°C non ha alterato la qualità del materiale estratto.

La RT-PCR ha consentito di quantificare l'RNA isolato e di verificare che esiste una variabilità nelle quantità di trascritto tra le categorie di fertilità da noi definite. L'espressione genica di **LDHC** e **Sam68** ha dimostrato un pattern di espressione conforme a quanto osservato in altre specie e uniformità di espressione intracategoria qualificandosi quindi come utile marker di fertilità .

Il gene **SP22** ha manifestato nello stallone un certo grado di variabilità di espressione intercategoria e seppure lasciando spazio ad interessanti considerazioni sembra non consentire la differenziazione tra la categoria degli ipofertili e quella dei mediamente fertili, rischiando di penalizzare eccessivamente il giudizio qualitativo di questi ultimi. Questo studio, pur non essendo stato esente da difficoltà, ha fornito informazioni utili per l'utilizzo dei geni **LDHC**, **Sam68** e **SP22** come markers nel settore della riproduzione equina e lo spunto per la creazione di kit per la loro valutazione .

Prospettiva futura di questo lavoro è la necessità di sondare l'espressione di altri geni, associando alla genomica anche la proteomica. Inoltre si potrebbero andare a dragare, a livello genomico, eventuali mutazioni dei geni in oggetto o dei loro trascritti.

Il problema, contro cui ci si scontra, nel momento dell'attuazione di questi studi è che, specialmente in Italia , non vi è alcuna selezione delle fattrici sulla base della loro fertilità e queste spesso presentano patologie dell'apparato riproduttivo correlate all'età avanzata. Questa condizione enfatizza la necessità di lavorare con materiale seminale di provata fertilità, nella speranza di ottimizzare il numero dei nati .

L'importanza della genomica nel campo della clinica della riproduzione, sia Veterinaria che Umana, risiede nel fatto che la considerazione dei soli parametri classici di motilità e concentrazione non è più esaustiva e descrittiva della reale situazione clinica presente nei soggetti e la necessità di aprirsi alle frontiere della biologia molecolare è quanto mai attuale e imprescindibile.

Il presente studio vuole essere di sostegno anche ai moltissimi Veterinari di campo che ogni giorno si scontrano con insuccessi dovuti alla mancanza di normative che impediscano la commercializzazione di materiale seminale non idoneo e che li rendono, agli occhi dei proprietari, responsabili del fallimento.

7 Bibliografia

1. Dadoune JP. The nuclear status of human sperm cells. *Micron*. 1995;26(4):323.
2. Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med*. 2005;11(4):156-163.
3. Loir, M Bouvier, D Fornells, M Lanneau, M Subirana, J A. Interactions of nuclear proteins with DNA, during sperm differentiation in the ram. *Chromosoma*. 1985;92(4):304-312.
4. Parrington, John Parrington, F A Lai, Karl Swann. The soluble mammalian sperm factor protein that triggers Ca²⁺ oscillations in eggs: Evidence for expression of mRNA(s) coding for sperm factor protein(s) in spermatogenic cells. *Biology of the cell*. 2000;92(3-4):267-275.
5. Lalancette, Claudia Miller, David Li, Yan Krawetz, Stephen. Paternal contributions: New functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem*. 2008;104(5):1570.
6. Ward WSW. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: Comparison with somatic cells. *BiolReprod*. 1991;44(4):569-574.
7. Risley, M S Einheber, S Bumcrot, D A. Changes in DNA topology during spermatogenesis. *Chromosoma*. 1986;94(3):217.
8. Vogelstein, Bert Vogelstein, Drew Pardoll, Donald Coffey. Supercoiled loops and eucaryotic DNA replication. *Cell*. 1980;22(1):79-85.

9. Lewis, John Lewis, Yue Song, Miriam Jong, Sabira Bagha, Juan Ausió. A walk through vertebrate and invertebrate protamines. *Chromosoma*. 2003;111(8):473-482.
10. Varner DD. Developments in stallion semen evaluation. *Theriogenology*. 2008;70(3):448-462.
11. Ball B. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A review. *Journal of equine veterinary science*. 2008(11):650-665.
12. Love, C C Garcia, M C Riera, F R Kenney, R M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*. 1991;44:99-105.
13. Johansson CS, Matsson FC, Lehn-Jensen H, Nielsen JM, Petersen MM. Equine spermatozoa viability comparing the NucleoCounter SP-100 and the eosin–nigrosin stain. *AnimReprod Sci*. 2008;107(3–4):325-326.
14. Amann, R P Katz, D F. Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*. 2004;25(3):317.
15. Giesecke K, Sieme H, Distl O. Infertility and candidate gene markers for fertility in stallions: A review. *The Veterinary Journal*. 2010;185(3):265-271.
16. Parlevliet, Joyce Parlevliet, Christopher Pearl, Monna Hess, Thomas Famula, Janet Roser. Immunolocalization of estrogen and androgen receptors and steroid concentrations in the stallion epididymis. *Theriogenology*. 2006;66(4):755-765.
17. Krausz CG, C. Genetic risk factors in male infertility. *Systems biology in reproductive medicine*. 2007;53(3):125.

18. Sieme H, Distl O. Genomics and fertility in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*. 2012;32(8):467-470.
19. Leeb T, Sieme H, Topfer Petersen E. Genetic markers for stallion fertility--lessons from humans and mice. *AnimReprod Sci*. 2005;89:21-29.
20. Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. In: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. Vol Volume 40. Academic Press:25-94. [http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)60839-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60839-9).
21. Oliva RO. Protamines and male infertility. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):417-435.
22. Sette, C Sette, V Messina, M P Paronetto. Sam68: A new STAR in the male fertility firmament. *J Androl*. 2010;31(1):66-74.
23. Lukong KL, Stéphane Richard. Sam68, the KH domain-containing superSTAR. *Biochimica et biophysica acta. CR, Reviews on cancer*. 2003;1653(2):73-86.
24. Paronetto MP, Claudio Sette. Role of RNA-binding proteins in mammalian spermatogenesis. *Int J Androl*. 2010;33(1):2-12.
25. Taylor, Stephen Taylor, Ross Resnick, David Shalloway. Sam68 exerts separable effects on cell cycle progression and apoptosis. *BMC cellbiology*. 2004;5(1):5.
26. Busa, R Bus, M P Paronetto, D Farini, E Pierantozzi, F Botti, D F Angelini, F Attisani, G Vespasiani, C Sette. The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells. *Oncogene*. 2007;26(30):4372-4382.

27. Richard, S Richard, G Vogel, M-É Huot, T Guo, W J Muller, K E Lukong. Sam68 haploinsufficiency delays onset of mammary tumorigenesis and metastasis. *Oncogene*. 2008;27(4):548-556.
28. Chawla, G Chawla, C.-H. Lin, A Han, L Shiue, M Ares, D L Black. Sam68 regulates a set of alternatively spliced exons during neurogenesis. *Mol Cell Biol*. 2009;29(1):201-213.
29. Lukong, Kiven Chang, Edouard Khandjian, Stéphane Richard. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends in genetics*. 2008;24(8):416-425.
30. Paronetto, M P Paronetto, V Messina, E Bianchi, M Barchi, G Vogel, C Moretti, F Palombi, M Stefanini, R Geremia, S Richard, C Sette. Sam68 regulates translation of target mRNAs in male germ cells, necessary for mouse spermatogenesis. *J Cell Biol*. 2009;185(2):235-249.
31. Zhang ZZ. Deficiency of SPAG16L causes male infertility associated with impaired sperm motility. *BiolReprod*. 2006;74(4):751-759.
32. Goldberg, E Eddy, E M Duan, C Odet, F. LDHC: The ultimate testis-specific gene. *J Androl*. 2010;31(1):86.
33. Markert, C Markert, J Shaklee, G Whitt. Evolution of a gene. multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science*. 1975;189(4197):102-114.
34. Mannen H. The cDNA cloning and molecular evolution of reptile and pigeon lactate dehydrogenase isozymes. *Mol Biol Evol*. 1997;14(11):1081.

35. Li SSL. Differential activity and synthesis of lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart), and C (testis) in mouse spermatogenic cells. *BiolReprod.* 1989;40(1):173-180.
36. Odet, Fanny Duan, Chongwen Willis, William Goulding, Eugenia Kung, Aisha Eddy, Edward Goldberg, Erwin. Expression of the gene for mouse lactate dehydrogenase C (*ldhc*) is required for male fertility. *BiolReprod.* 2008;79(1):26.
37. Shima JES. The murine testicular transcriptome: Characterizing gene expression in the testis during the progression of spermatogenesis. *BiolReprod.* 2004;71(1):319-330.
38. Tang, HuangHuiKung, Aisha Goldberg, Erwin. Regulation of murine lactate dehydrogenase C (*ldhc*) gene expression. *BiolReprod.* 2008;78(3):455.
39. Fujimoto H, Erickson RP, Toné S. Changes in polyadenylation of lactate dehydrogenase-X mRNA during spermatogenesis in mice. *MolReprod Dev.* 1988;1(1):27-34.
40. SalehiAshtiani KS. Posttranscriptional regulation of primate *ldhc* mRNA by its AUUUA-like elements. *Molecular endocrinology.* 1995;9(12):1782-1790.
41. Alcivar, A ATrasler, J M Hake, L E SalehiAshtiani, K Goldberg, E Hecht, N B. DNA methylation and expression of the genes coding for lactate dehydrogenases A and C during rodent spermatogenesis. *BiolReprod.* 1991;44(3):527.
42. Mita MM. Metabolism of round spermatids from rats: Lactate as the preferred substrate. *BiolReprod.* 1982;26(3):445-455.

43. Odet, F Gabel, S A Williams, J London, R E Goldberg, E Eddy, E M. Lactate dehydrogenase C and energy metabolism in mouse sperm. *BiolReprod.* 2011;85(3):556.
44. Duan CD, E Goldberg. Inhibition of lactate dehydrogenase C₄(LDH-C₄) blocks capacitation of mouse sperm in vitro. *Cytogenetic and Genome Research.* 2003;103(3-4):352-359.
45. WELCH JE, BARBEE RR, ROBERTS NL, SUAREZ JD, KLINEFELTER GR. SP22: A novel fertility protein from a highly conserved gene family. *J Androl.* 1998;19(4):385-393.
46. Wrench N. Seasonal expression and pattern of SP22 immunolocalization in stallion semen. *AnimReprod Sci.* 2006;94(1-4):32-35.
47. Troedsson M, Miller L, Roberts K. CRYOPRESERVATION OF EQUINE SPERMATOZOA ALTERS THE EXPRESSION OF SPERM PROTEIN 22 kDa (SP22). *TRANSPORTING GAMETES AND EMBRYOS.* 2004:83.
48. Klinefelter GR. Saga of a sperm fertility biomarker. *AnimReprod Sci.* 2008;105(1-2):90-103.
49. Miller LMJ. Expression of equine sperm protein 22 kDa (SP22) in testicular and epididymal tissue. *AnimReprod Sci.* 2006;94(1-4):54-55.
50. Veeramachaneni, D. N. R. Veeramachaneni, J S Palmer, G R Klinefelter. Chronic exposure to low levels of dibromoacetic acid, a water disinfection by-product, adversely affects reproductive function in male rabbits. *J Androl.* 2007;28(4):565-577.

51. Klinefelter GRK. Bromochloroacetic acid exerts qualitative effects on rat sperm: Implications for a novel biomarker. *Toxicological sciences*. 2002;68(1):164-173.
52. Klinefelter GRK. Continuous exposure to dibromoacetic acid delays pubertal development and compromises sperm quality in the rat. *Toxicological sciences*. 2004;81(2):419-429.
53. Das P, Paria N, Gustafson Seabury A, et al. Total RNA isolation from stallion sperm and testis biopsies. *Theriogenology*. 2010;74(6):1099-1106.
54. RNeasy® lipid tissue handbook, QUIAGEN. . February 2009.
55. Kotewicz M, D'Alessio J, Driftmeier K, Blodgett K, Gerard G. *Gene* 35, 249. . 1985.
56. Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC. *DNA* 5:4, 271. . 1986.
57. M-MLV reverse transcriptase handbook, invitrogen™.
58. FastStart SYBR green master handbook, ROCHE, 2007.
59. Paronetto MPP. The nuclear RNA-binding protein Sam68 translocates to the cytoplasm and associates with the polysomes in mouse spermatocytes. *MolBiol Cell*. 2005;17(1):14-24.
60. Miller DM. RNA in the ejaculate spermatozoon: A window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine*. 1997;3(8):669-676.

61. Wieben ED. Regulation of the synthesis of lactate dehydrogenase-X during spermatogenesis in the mouse. *J Cell Biol.* 1981;88(3):492.
62. WAGENFELD A. Expression and cellular localization of contraception-associated protein 1. *J Androl.* 2000;21(6):954.
63. Ganguly I, Gaur GK, Kumar S, et al. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred frieswal (HF×Sahiwal) bulls. *Res Vet Sci.* 2013;94(2):256.

8 Ringraziamenti

Alla *Professoressa Maria Elena Falomo*, docente molto preparata e grande maestra di vita.

Al laboratorio della *Professoressa Barbara Zavan e alla sua equipe*, per avermi seguito con passione durante lo svolgimento dello studio.

Ai cinque centri stalloni che hanno dato la loro disponibilità per i prelievi del materiale seminale; un sentito grazie va al *Sig. Loris Tieppo*, per la gentilezza con la quale mi ha sempre accolto nella sua azienda.

Un sentito grazie ad una grandissima amica, *Sara Rizzo*, per avermi sopportato in questo percorso di vita universitaria e avermi sempre spinto a non mollare mai a fronte delle tante difficoltà.

Al mio grandioso gruppo di tirocinio, *Sara, Mauro e Lorena*.

Grazie di cuore alla mia grandissima amica *Giulietta*, presenza imprescindibile nei momenti di prova e mia grande confidente.

Alla carissima amica *Giulia Xocato*, per avermi fatto riscoprire la gioia di vivere nei momenti più bui del mio percorso.

Un sentito grazie al grande *Filippo*, persona che mi ha insegnato a guardare alla vita con positività e spensieratezza.

Allo *zio Nereo*, che si è sempre interessato molto calorosamente all'andamento del mio percorso di studi e mi ha sostenuto con un sorriso.

Allo *zio Siro*, presenza imprescindibile per l'impaginazione di questa tesi.

Un grazie alla *Professoressa Nadia Bonaldo*, per avermi trasmesso una grande passione per la biologia e la medicina.

Al *Dottor Giorgio Zanetti*, per avermi seguito con passione nella mia formazione pratica.

Al *nonno Raffaele*, il mio secondo padre e al *nonno Silverio*, per avermi sostenuto con grande fede.

Alla mia famiglia, per l'incredibile disponibilità e il sostegno che mi ha dato.

Infine, un sentito grazie alle persone che hanno finito il loro viaggio in questa terra ma che hanno fatto parte della mia vita e mi hanno aiutato a maturare e ad arrivare fino a questa meta, la *nonna Esterina*, gli amici *Giorgia e Fabrizio* e i docenti *Riccardo Dal Zotto e Stefania Testoni*.