



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

**“CARATTERISTICHE BIOCHIMICHE DEL
LIQUIDO SEMINALE DI ALPACA (*LAMA
PACOS*)”**

Relatore: Ch.mo Dott. Calogero Stelletta

Laureanda: Irene Marion

ANNO ACCADEMICO 2008 – 2009

Alla mia famiglia, per tutto il sostegno e la pazienza.

Sommario

<u>CAPITOLO I</u>	1
<u>Introduzione</u>	1
<u>1.1 Il plasma seminale</u>	1
<u>1.1.1 Componenti biochimici</u>	2
<u>1.1.1.1 Proteine</u>	4
<u>1.1.1.2 Aminoacidi ed enzimi</u>	7
<u>1.1.1.3 Ioni</u>	10
<u>1.1.1.4 Zuccheri riducibili</u>	11
<u>1.1.1.5 Profilo lipidico</u>	12
<u>1.1.1.6 Antiossidanti</u>	12
<u>1.1.1.7 Ormoni</u>	13
<u>1.1.1.8 Citochine</u>	14
<u>1.1.1.9 Vescicole di membrana</u>	15
<u>1.2 Il plasma seminale nei camelidi, con particolare riferimento agli alpaca (Lama pacos)</u>	15
<u>1.2.1 Componenti biochimici</u>	16
<u>1.2.1.1 Proteine</u>	16
<u>1.2.1.2 Ioni</u>	16
<u>1.2.1.3 Zuccheri riducibili</u>	17
<u>1.2.1.4 Profilo lipidico</u>	17
<u>CAPITOLO II</u>	18
<u>Materiali e metodi</u>	18
<u>2.1 Prelievo del seme</u>	18
<u>2.1.1 Animali</u>	18
<u>2.1.2 Vagina artificiale modificata</u>	20
<u>2.1.3 Standardizzazione dei prelievi di seme</u>	23
<u>2.1.4 Periodi a diversa alimentazione</u>	24
<u>2.1.5 Annullamento delle interferenze legate alle diverse temperature stagionali</u>	26

<u>2.1.6 Valutazione e trattamento preliminari del seme dopo il prelievo</u>	27
<u>2.2 Prelievo di sangue</u>	29
<u>2.3 Misure testicolari e BCS</u>	30
<u>2.4 Esami di laboratorio</u>	31
<u>2.4.1 Esame biochimico del plasma seminale (SP)</u>	31
<u>2.4.2 Esame biochimico del plasma ematico (BP)</u>	31
<u>2.4.3 Esame elettroforetico delle proteine del plasma seminale</u>	32
<u>2.5 Analisi statistiche</u>	34
<u>CAPITOLO III</u>	35
<u>Risultati</u>	35
<u>3.1 Biochimico del plasma ematico, per periodo e settimana</u>	35
<u>3.2 Biochimico del plasma seminale, per periodo e settimana</u>	38
<u>3.3 Valutazione della qualità del seme, per periodo e settimana</u>	42
<u>3.4 Immagini dei gel di elettroforesi</u>	44
<u>3.5 Valori del peso molecolare, delle percentuali e del valore assoluto delle proteine, per periodo e settimana</u>	52
<u>4.6 Biochimico del plasma ematico, per periodo ed animale</u>	54
<u>4.7 Biochimico del plasma seminale, per periodo ed animale</u>	61
<u>4.8 Valutazione della qualità del seme, per periodo ed animale</u>	65
<u>4.9 Valori assoluti delle proteine, per periodo ed animale</u>	67
<u>4.10 Indici di correlazione</u>	69
<u>CAPITOLO IV</u>	76
<u>Discussione</u>	76
<u>Conclusioni</u>	83
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	84
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	104

CAPITOLO I

Introduzione

1.1 Il plasma seminale

Il plasma seminale (SP) è una componente essenziale dell'eiaculato. Rappresenta la porzione liquida del seme, in cui sono veicolati gli spermatozoi. I costituenti biochimici, variabili nelle diverse specie animali, sono prodotti principalmente dalle ghiandole accessorie dell'apparato genitale maschile, ovvero vescichette seminali, prostata e ghiandole bulbo-uretrali, tra cui principalmente le vescichette seminali (tranne nei camelidi dove queste sono assenti (Juyena and Stelletta, 2009)). Altri siti di produzione secondaria solo la rete testis e l'epididimo (Mann and Lutwak-Mann, 1981).

Si è spesso ritenuto, in maniera semplicistica, che il SP avesse una funzione limitata a mezzo di trasporto e di nutrizione per gli spermatozoi a livello di vie genitali femminili. Alcune ricerche mettono però in evidenza che animali inseminati tramite inseminazione artificiale (AI), e quindi con seme in cui il liquido seminale è stato fortemente diluito o del tutto eliminato, incorrono in una diminuzione della fertilità rispetto all'inseminazione con monta naturale, suggerendo per il plasma seminale un'azione importante anche per quanto riguarda funzione degli spermatozoi, fertilizzazione e sviluppo embrionale nelle prime fasi (Tummaruk et al., 2000).

1.1.1 Componenti biochimici

I componenti biochimici del plasma seminale sono vari e variabili. Comprendono peptidi, proteine, aminoacidi, substrati energetici, ioni, ormoni ed altro. Ciascun gruppo verrà brevemente e singolarmente preso in considerazione nei paragrafi successivi. La variabilità di composizione è legata alla capacità di produzione, immagazzinamento e secrezione degli organi coinvolti (tra cui soprattutto le ghiandole accessorie dell'apparato genitale maschile). Tale variabilità viene riscontrata tra diverse specie, nella stessa specie tra maschi differenti e anche nello stesso maschio tra più eiaculati (Killian et al., 1993; Aurich et al., 1996). Le variazioni di alcuni parametri potrebbero anche essere collegate a differenze nella gestione d'allevamento, nell'alimentazione e nella stabulazione, ma ulteriori studi sono necessari. Un riassunto dei componenti fin'ora studiati è mostrato nella Tabella n°1.

Tabella n° 1. Composizione del plasma seminale nei ruminanti e nei camelidi (l'unità di misura, se non altrimenti specificata, è da considerarsi mg/dl).

Contenuto	Tori	Arieti	Becchi	Bufali	Camelidi del Vecchio Mondo	Camelidi del Nuovo Mondo
Fruttosio	150 - 900	150 - 600	875	368 - 815	23,5	3 - 7
Glucosio	300	0,9 - 1,6	4,8 - 8,8	13 - 52	29 - 42	4 - 8
Acido citrico	340 - 1,150	110 - 260	-	440 - 444	9,80	3,10 - 6
Proteine totali (g/dl)	3,80	2,30 - 2,50	0,77 - 1,48	-	1,60 - 2,60	3 - 4
Lipidi totali	29	254 - 396	-	150 - 175	87	51 - 115
Fosfolipidi	149,1	-	57	6,9 - 59,4	26 - 48	27 - 31
Colesterolo	312,16	-	-	117,83	15,30 - 25,90	-
Acido glutammico	1 - 8	4,50 - 5,20	-	4,28	-	-
Na	140 - 280	120 - 258	60 - 183	260 - 278	-	-
K	80 - 210	50 - 140	76 - 255	192 - 205	-	-
Ca	35 - 60	6 - 15	5 - 15	30	7,7 - 8,8	13 - 31
P	9	4,8 - 12,0	-	8 - 9	1,7 - 4,6	7 - 17
Cl	110 - 290	86	82 - 215	303 - 347	84 - 120	263 - 491
Mg	7 - 12	2 - 13	1 - 4	4,3 - 5,7	-	-
Zn	2,60 - 3,70	56 - 179	-	0,80 - 1,17	-	-
Testosterone (pg/ml)	210 - 1310	25 - 375	-	970	-	-
Estrogeni (pg/ml)	20 - 166	-	-	43,67	-	-
Prostaglandine (ng/ml)	5 - 10	500 - 20.000	-	-	-	-
ALP	246 BU/dl	14,895 - 40.818 mUΦ/ml	-	315 BU/dl	-	-
AST	345 - 623 SFU/ml	190 - 256 mUΦ/ml	-	166 unità*/ml	-	-
ALT	150 - 18.3 SFU/ml	39 - 148 mUΦ/ml	-	34 unità*/ml	-	-
LDH	1.909 unità*/ml	968 - 1.697 mUΦ/ml	-	1.621 BBU/ml	-	-

BU = Bodansky Units; SFU = Sigma Frankel Unit; BBU = Berger-Broida Units;

* L'unità citata corrisponde all'attività del SP che produce un µg di piruvato.

Φ mU = micro Unità

(Flipse, 1960; Singh et al., 1969; Chauhan and Srivastav, 1973; Kozumplik and Vinkler, 1982; El-Manna et al., 1986; Garnica et al., 1993; Pineda, 1995; Zedda et al., 1996; Javed et al., 2000; Shore et al., 2003; Mosafieri et al., 2005; Gundogan, 2006; Andrabi, 2009; Juyena and Stelletta, 2009).

1.1.1.1 Proteine

Le numerose proteine presenti nel plasma seminale sono prodotte principalmente da epididimo e vescichette seminali (Chandonnet et al., 1990). Sembra che abbiano rilevanti effetti sulla stabilità di membrana degli spermatozoi (Desnoyers and Manjunath, 1992), sulla motilità (Henricks et al., 1998; Sánchez-Luengo et al., 2004) e la capacitazione degli stessi (Therien et al., 1998) e sull'interazione con la cellula uovo (Yanagimachi, 1994). Inoltre favoriscono la fagocitosi degli spermatozoi avitali e l'attività dei polimorfonucleati grazie all'azione delle proteasi (Dacheux et al., 2003).

Nel toro sono state isolate delle proteine leganti l'eparina (HBPs), denominate proteine del plasma seminale bovino (BSPs). La loro produzione è a carico delle vescichette seminali e, fin'ora, ne sono state individuate quattro: BSP-A1, BSP-A2 (chiamate anche PDC-109), BSP-A3 e BSP-30 kDa. Queste proteine sono in grado, una volta entrate a far parte del plasma seminale, di rimuovere una certa quantità di colesterolo (5 - 8%) dalla membrana degli spermatozoi e di legarsi ai fosfolipidi, interferendo con la loro mobilità e quindi rendendo più stabile l'intera membrana (Villemure et al., 2003). BSP-A1, BSP-A2 e BSP-A3 hanno identica composizione aminoacidica e peso molecolare compreso tra 15 e 16,5 kDa, ma differiscono nell'estensione della glicosilazione, mentre BSP-30 kDa non risulta glicosilata. BSP-A1, BSP-A2 e BSP-A3 legano specificatamente fosfolipidi contenenti fosforilcolina (PC), mentre BSP-30 kDa può legare anche fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositolo, acido fosfatidico e cardiolipina (Desnoyers and Manjunath 1992). Le BSPs si legano anche a livello di acrosoma, post-acrosoma e regioni mediane degli spermatozoi, giocando un ruolo probabilmente importante nell'inizio della motilità spermatica (Scheit et al., 1988; Manjunath et al., 1993). Favoriscono inoltre, nelle vie genitali femminili, il legame degli spermatozoi all'epitelio dell'ovidotto, portando alla costituzione di un reservoir di spermatozoi in cui la motilità viene mantenuta (Ignotz et al., 2001; Gwathmey et al., 2006). Therien et al. (2001) ha ipotizzato un ruolo anche nella capacitazione: le BSPs legate alla membrana spermatica, raggiunte le vie genitali femminili, interagirebbero con lipoproteine ad alta densità (HDL) presenti nell'ovidotto e/o nel liquido follicolare; questo porterebbe al distacco delle BSPs e del colesterolo dagli spermatozoi, con alterazione dell'equilibrio prima raggiunto dalla membrana plasmatica ed induzione di segnali intracellulari che porterebbero all'aumento della

permeabilità di membrana al Ca^{2+} . Le BSPs che rimangono invece legate ai fosfolipidi di membrana, funzionerebbero da collegamento con la calmodulina, presente a livello di membrana plasmatica interna e partecipante agli eventi che regolano l'ingresso del Ca^{2+} durante la capacitazione e la reazione acrosomiale (Manjunath et al, 1993). Yu et al. (2003) ipotizzano invece che le PDC-109 prevengano una reazione acrosomiale prematura inibendo la proteina chinasi C. Tutte queste funzioni sono determinanti per un corretto stato di mantenimento del seme anche se, per la stimolazione delle BSPs, è necessaria la presenza di eparina o lipoproteine ad alta densità o glicosaminoglicani (GAG) presenti nelle secrezioni dell'ovidotto femminile (Manjunath and Therien, 2002).

Proteine simili alle BSPs sono state riscontrate nel plasma seminale di verro (pB1) (Sanz et al., 1993; Calvete et al., 1997), di stallone (HSP-1, HSP-2, HSP-12 kDa) (Calvete et al., 1995, 1997; Mènard et al., 2003), di bisonte (BiSV-16 kDa, BiSV-17 kDa, BiSV-18 kDa, BiSV-28 kDa) (Boisvert et al., 2004), di ariete (RSP- 14 kDa, RSP-16 kDa, RSP-20 kDa, RSP-24 kDa) (Jobim et al., 2005; Bergeron et al., 2005) e di becco (GSP-14 kDa, GSP-15 kDa, GSP-20 kDa, GSP-22 kDa) (Villemure et al., 2003). Le loro funzioni non sono ancora state chiarite ma probabilmente sono simili a quelle delle BSPs. Recentemente è stata individuata la presenza di PDC-109 anche nel SP di bufalo (Harshan et al. 2008).

Un'altra famiglia di proteine, le spermadesine, sono state individuate nel toro (Einspanier et al., 1994), nell'ariete (Bergeron et al., 2005) e nel becco (Luciana et al., 2007). Queste proteine hanno un peso molecolare compreso tra 12 e 16 kDa e inizialmente furono classificate in modo generico come aSFP (acidic seminal fluid protein) (Teixeira et al., 2002). Dagli studi effettuati si è visto che le spermadesine sono associate alla superficie degli spermatozoi e vengono prodotte dalle vescichette seminali (Teixeira et al., 2006), una in particolare (AWN-1) anche da epididimo, rete testis e tubuli retti (Topfer-Petersen et al., 1998). Sono proteine multifunzionali che mostrano affinità di legame con vari oligosaccaridi, polisaccaridi solfati, inibitori delle serin-proteasi e fosfolipidi (Töpfer-Petersen et al., 1998) e inoltre interagiscono con glicosaminoglicani simil-eparina prodotti dall'epitelio del tratto genitale femminile (Tienthai et al., 2000). Ciò fa pensare che abbiano un ruolo nella capacitazione e nell'interazione con la cellula uovo (Jonakova et al., 1998). Un altro ruolo è quello di ridurre la perossidazione lipidica e regolare

l'attività dei mitocondri. In questo modo preservano energia e mantengono la vitalità degli spermatozoi (Schoneck et al., 1996).

Nell'insieme queste proteine (BSP e spermadesine) vengono comunemente chiamate "anti-shock" perché sembrano proteggere gli spermatozoi dai danni dovuti a shock da freddo (ovvero la discesa improvvisa della temperatura dai 20 ai 0 °C). In verità, come riportato da Muiño-Blanco et al. (2008), il legame delle proteine con la membrana spermatica, che protegge le cellule dal freddo, tende contemporaneamente, a danneggiare gli spermatozoi stessi durante il congelamento, perché la discesa eccessiva della temperatura provoca probabilmente un'alterazione della struttura proteica e quindi di quella degli spermatozoi. Si è visto infatti che se le frazioni del seme, liquida e cellulare, vengono separate immediatamente dopo il prelievo, gli spermatozoi non subiscono alterazioni durante il congelamento. L'aggiunta successiva della parte liquida, dopo che il seme è stato scongelato, ne migliora le caratteristiche.

Bradley et al. (1982) hanno invece purificato, nell'ariete, una frazione proteica acida a basso peso molecolare stabile al calore, che viene chiamata calcemina. Essa agisce come un regolatore Ca^{2+} dipendente di due enzimi: la Mg^{2+} -ATPasi Ca^{2+} -dipendente e la 3' - 5' nucleotide ciclico fosfodieterasi. Probabilmente stimola l'attività Ca^{2+} dipendente a livello di flagello. Un'altra proteina calmodulina simile (CLP, calmoduline-like protein) è stata identificata nel plasma seminale di bufalo. Tale proteina è presente in alta concentrazione e si pensa abbia un ruolo nella capacitazione e nella reazione acrosomiale (Sidhu and Guraya, 1989).

Nel SP di toro è stata separata anche una molecola d'adesione chiamata osteopontina (OPN), di 55 kDa, derivante dall'ampolla e dalle vescichette seminali (Cancel et al., 1997). Probabilmente l'OPN si lega agli spermatozoi al momento dell'eiaculazione e rimane legata fino al momento della fertilizzazione (Souza et al., 2008), partecipando poi alla fertilizzazione stessa e ai primi stadi di sviluppo embrionale (Goncalves et al., 2006; Souza et al., 2008).

Sempre nel toro è stato isolato un peptide, denominato seminalplasma (SPNL) (Reddy and Bhargava, 1979) o caltrina, che viene prodotto dalle vescichette seminali (Wempe et al., 1990). Le funzioni sono molteplici: inibire la trascrizione (Scheit et al., 1985); regolare il

trasporto di Ca^{2+} (Sitaram et al., 1997); incrementare la fluidità di membrana degli spermatozoi e dell'acrosoma (Shivaji et al., 1989); bloccare l'esocitosi spontanea dell'acrosoma inibendo la pompa $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, ma anche stimolare gli antagonisti della zona pellucida per permettere una corretta reazione acrosomiale (Clark et al., 1993).

Alcune proteine, nel becco, sono assenti durante la stagione non riproduttiva (Cardozo et al., 2006), mentre altre sono sempre presenti ma in minor quantità durante la stagione non riproduttiva (Smith et al., 1999). Queste variazioni stagionali nei profili proteici potrebbero essere collegate ai differenti livelli di gonadotropine e alla diminuzione del numero dei loro specifici recettori a livello testicolare. Ciò porterebbe ad una diminuzione della funzionalità endocrina delle gonadi e quindi anche della funzionalità escretoria di epididimo e ghiandole seminali (Xu et al., 1991).

1.1.1.2 Aminoacidi ed enzimi

La maggior parte degli aminoacidi presenti vengono prodotti a livello di testicoli ed epididimo, e solo in parte nelle ghiandole sessuali accessorie. La loro concentrazione tende ad aumentare dopo l'eiaculazione a causa dei massivi processi di catabolismo proteico che si instaurano nel seme. Gli aminoacidi servono come substrato energetico a veloce reperibilità, necessario alle reazioni cui il seme deve andare incontro (Newmark et al., 1967). Gli aminoacidi più rappresentati sono l'acido glutammico e l'L-arginina.

Gli enzimi presenti sono la Glutammato-Ossalacetato Transaminasi (GOT), l'Aspartato Amino Trasferasi (AST), la Glutammato-Piruvato Transaminasi (GPT), l'Alanina Aminotransferasi (ALT), la Fosfatasi Alcalina (ALP) e la Lattato Deidrogenasi (LDH). Essi sono necessari alle reazioni metaboliche che forniscono l'energia agli spermatozoi. Inoltre, localizzandosi soprattutto a livello di membrana spermatica, sono considerati degli indicatori di stabilità della membrana stessa e quindi della qualità del seme (Corteel, 1980).

Le transaminasi sono dislocate principalmente al centro della cellula spermatica (Mann et al., 1981) e la loro presenza nel plasma seminale a livelli elevati viene considerata come segno di danno agli spermatozoi (Sirat et al., 1995) o alterazione della funzionalità di membrana dovuta ad una non corretta maturazione spermatica a livello di epididimo, spesso a causa di una eccessiva frequenza di prelievo del seme.

La lattato deidrogenasi, presente nel citosol e nella matrice mitocondriale degli spermatozoi (Montamat et al., 1976; Burgos et al., 1995), è considerata un isoenzima della lattato deidrogenasi presente nei tessuti somatici, in quanto le catene aminoacidiche differiscono (Zinkham et al., 1963; Li et al., 1983). L'enzima si trova debolmente legato alla parete cellulare e ciò ne facilita il rilascio nel plasma seminale (Rao et al., 1984). La sua funzione è quella di regolare la glicolisi in caso di carenza di ossigeno: il piruvato viene trasformato in lattato durante una reazione mediata dall'NADH (Jones, 1997). Una ridotta produzione di lattato deidrogenasi da parte del parenchima testicolare può portare a disturbi della funzionalità spermatica e a cambiamenti nel metabolismo spermatico.

La fosfatasi alcalina viene prodotta, per la maggior parte, dalle ghiandole seminali accessorie. Si è riscontrata la sua attività sia a livello di testa e parte centrale dello spermatozoo, sia a livello di coda. Questo enzima regola la defosforilazione proteica, uno dei passaggi importanti nel complesso fenomeno dell'acquisizione della motilità spermatica (Tang et al., 1975).

La fosfolipasi A₂ (PLA₂) è un enzima ubiquitario che idrolizza il legame estere tra l'acido grasso in posizione 2 ed il glicerolo dei fosfolipidi, ed è stato ritrovato anche nel liquido seminale di numerose specie animali (Upreti et al., 1999). Probabilmente la PLA₂ partecipa alla reazione acrosomiale (Fry et al., 1992) e alla fusione spermatozoo - cellula uovo (Yuan et al., 2003).

Un altro enzima con attività di fosfolipasi è stato ritrovato nel becco e chiamato enzima coagulante l'albume d'uovo (EYCE, egg yolk coagulating enzyme) o SBUIII. L'EYCE idrolizza i fosfolipidi presenti nell'albume d'uovo utilizzato nei diluenti per la conservazione del seme, e li trasforma in acidi grassi insaturi e lipofosfolipidi che risultano tossici per il seme e lo fanno coagulare (Roy, 1957). Dopo la purificazione questo enzima è risultato essere una N-glicoproteina monomerica di 55 - 60 kDa (BUSgp60) con affinità per l'eparina. Sias et al. (2005) hanno dimostrato che BUSgp60 è una proteina tipo 2 associata a lipasi pancreatica (PLRP2, pancreatic-lipase-related proteins 2) con attività di fosfolipasi A₁. La funzione di questa proteina nel plasma seminale non è ancora chiara ma probabilmente agisce nel processo di pulizia dell'uretra che avviene prima del passaggio

del seme, grazie ad una secrezione mucoide prodotta dalle ghiandole bulbo-uretrali (Sias et al., 2005).

Il plasma seminale contiene anche acetil-idrolasi del fattore attivante le piastrine (PAFAHs, platelets activating factor acetylhydrolase), considerato un protettore del seme nelle vie genitali femminili. Il PAF ha un suo ruolo nella capacitazione degli spermatozoi ma la presenza, nelle vie genitali femminili, di PAF di origine spermatica provoca una reazione infiammatoria con richiamo di neutrofili e formazione di superossidi che possono portare a gravi danni cellulari e a blocco della motilità spermatica (Kovalsky et al., 1992). Le PAFAHs potrebbero essere responsabili dell'inibizione del PAF di derivazione spermatica e dell'idrolizzazione dei fosfolipidi danneggiati in modo da prevenire i danni cellulari (Hough et al., 1994).

Nel toro sono state isolate delle arilsulfatasi (AS-A, -B e -C), la cui funzione si esplica nel miglioramento della stabilità e permeabilità della membrana plasmatica degli spermatozoi, tramite la rimozione dei gruppi solfato da molecole steroidee e glicoconjugate (Gadella et al., 1991). Langlais et al. (1985) ipotizzano che l'AS-C sia un promotore della capacitazione degli spermatozoi ma le ricerche sulle arilsulfatasi dovrebbero essere comunque approfondite.

Le funzioni di altri enzimi ritrovati nel plasma seminale sono totalmente oscure. L' α -1,4 glucosidasi è stata isolata nell'ariete ed è considerata un buon indicatore dello stato funzionale dell'epididimo, dato che da questo è principalmente prodotta (Tremblay et al., 1990). Guerin et al. (1981) hanno dimostrato una correlazione positiva tra l' α -1,4 glucosidasi e la concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato, mentre Tremblay et al. (1990) hanno evidenziato una correlazione negativa tra l'enzima e la motilità spermatica. La prostaglandin-H₂ D-isomerasi (PGDS) è stata invece rilevata nel liquido seminale di toro (Gerena et al., 1998), ariete e stallone (Fouchècourt, et al., 1999). Probabilmente è un enzima prodotto dall'epididimo perché non si è riusciti ad isolarlo nelle secrezioni delle vescichette seminali e nel SP di animali deferentomizzati. Il ruolo della PGDS è tuttora ignoto.

1.1.1.3 Ioni

Gli ioni sono una parte importante del plasma seminale.

Cationi quali sodio, calcio, potassio e magnesio mantengono l'equilibrio osmotico nel liquido seminale e sono delle componenti di importanti enzimi (Cevik et al., 2007). Il sodio è il catione presente in maggior quantità, tranne nel plasma seminale di toro, dove il più rappresentato è il calcio (Setchell et al., 1988). Il sodio è importante per la funzionalità spermatica (Mosaferi et al., 2005), mentre il calcio partecipa alla reazione acrosomiale e permette la motilità degli spermatozoi (Kaya et al., 2002). Il magnesio si ritrova spesso nei sistemi enzimatici, è considerato un marker della funzionalità escretoria delle vescichette seminali (Wong et al., 2001) e sembra abbia un suo ruolo per quanto riguarda la motilità spermatica (Jobim et al., 2004). Il potassio è un inibitore metabolico e alte concentrazioni di questo catione nel plasma seminale portano a diminuzione dell'attività metabolica e della motilità degli spermatozoi (Massaney et al., 2003). È stata riscontrata una correlazione negativa tra la concentrazione di sodio, calcio e magnesio e la percentuale di spermatozoi anormali, e invece una correlazione positiva se si considera la concentrazione di potassio (Assumpcao et al., 2005; Cevik et al., 2007). Il rame fa parte di enzimi come la Cu-Zn ossido dismutasi (SOD) che agisce contro i radicali liberi evitando danni cellulari. Inoltre alte concentrazioni di rame riducono i processi ossidativi che porterebbero a blocco della motilità e diminuzione della vitalità (Pesch et al., 2006). D'altra parte una concentrazione eccessiva, proprio per la sua funzione antiossidante, porterebbe a diminuzione o abolizione della motilità spermatica (Skandhan, 1992), in quanto i radicali liberi svolgono un ruolo importante nella maturazione e nella capacitazione spermatica (Aitken and Vernet, 1998). Nel bufalo è stata recentemente trovata una correlazione positiva tra la concentrazione di rame nel plasma seminale e la motilità spermatica, ed è stata ipotizzata una sua diretta stimolazione centrale che porterebbe a rilascio di LH (Eghbali et al., 2008). Lo zinco ha un'attività antiossidante (Gavella et al., 1998), sembra essere il maggiore responsabile dell'attività antibatterica nel plasma seminale e stabilizza l'assemblamento finale delle nucleoproteine e la membrana plasmatica degli spermatozoi (Lewis-Jones et al., 1996). Inoltre sembra controllare il metabolismo e la motilità degli spermatozoi tramite rispettivamente la regolazione dell'attività enzimatica e la regolazione del sistema ATP e

delle riserve di fosfolipidi (Hidiroglou et al., 1984). Hidiroglou et al. (1979) hanno ipotizzato che il testosterone regoli il turnover di zinco attraverso le ghiandole sessuali accessorie.

L'unico anione individuato è il cloro, che potrebbe giocare un suo ruolo durante la capacitazione e la reazione acrosomiale, durante la quale si aprono diversi canali ionici di membrana, tra cui quello appunto del cloro (Meizel, 1997; Purohit et al., 1999). Si è visto però che un aumento delle concentrazioni è legato ad una diminuzione della fertilità (Cevik et al., 2007).

1.1.1.4 Zuccheri riducibili

Il fruttosio è lo zucchero presente in maggiore quantità nel plasma seminale dei ruminanti e viene prodotto nelle vescichette seminali a partire dal glucosio ematico, sotto stimolazione del testosterone (Kumar et al., 1994). Si è visto che la concentrazione di fruttosio tende ad aumentare durante la stagione riproduttiva (Matasuoka et al., 2006). La sua funzione è quella di fungere da substrato riducibile e fornire energia agli spermatozoi (Gabriel et al., 1999). La concentrazione di fruttosio nel liquido seminale viene utilizzata come indicatore della concentrazione di androgeni, dato che sono quest'ultimi a regolarne la produzione (Mann et al., 1981).

Nello stallone, nel cui seme il fruttosio è presente in basse quantità, è possibile riscontrare la presenza di glucosio (Mann, 1964), ed anche il plasma seminale di coniglio contiene un'apprezzabile quantità di glucosio in aggiunta al fruttosio (Mann et al., 1950). Probabilmente questo zucchero ha una funzione energetica accessoria al fruttosio, e viene utilizzato in situazioni critiche.

Un altro zucchero presente nel plasma seminale è il sorbitolo. Nel liquido seminale di ariete è stato isolato l'enzima sorbitolo deidrogenasi che impedisce al sorbitolo di essere trasformato in fruttosio (Setchell et al., 1988).

1.1.1.5 Profilo lipidico

Il profilo lipidico è costituito da colesterolo, fosfolipidi, digliceridi, trigliceridi e cere. Probabilmente le fonti di lipidi per il plasma seminale sono l'epididimo e gli spermatozoi

stessi (Juyena et al., 2009). Si è osservato che la concentrazione di lipidi è maggiore nel primo eiaculato che nei successivi (Iqbal et al., 1984) e comunque diminuisce in caso di maschi vasectomizzati (Pickett et al., 1966). La funzione dei lipidi nel plasma seminale è molteplice: fanno parte della struttura spermatica, intervengono nel metabolismo e nella capacitazione degli spermatozoi e nella fertilizzazione del gamete femminile (Hafez, 1987). Il colesterolo ed i fosfolipidi sono le frazioni più rappresentate e sono fondamentali per la struttura e la funzionalità di membrana. Ciononostante un incremento del colesterolo può portare a deficit di fertilità perché sembra limitare il normale funzionamento della reazione acrosomiale (Cross, 1998). I fosfolipidi possono essere utilizzati come substrato energetico nel caso ci sia carenza di zuccheri riducibili (Scott et al., 1968), anche se ciò può portare ad effetti negativi sulla stabilità di membrana e giustificare la ridotta capacità fertilizzante del seme congelato. Georgiev (1983) e Taha et al. (2000) hanno dimostrato che una ridotta concentrazione di lipidi nel plasma seminale porta a sua volta ad una riduzione di concentrazione e motilità spermatica. La precisa funzione dei lipidi rimane, comunque, tutt'ora sconosciuta.

1.1.1.6 Antiossidanti

Gli spermatozoi sono altamente sensibili alla perossidazione lipidica (LPO) da parte di radicali liberi o specie reattive dell'ossigeno (ROS) come possono essere il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'anione superossido (O_2^-) ed il radicale idrossilico ($-OH$) (Aitken, 1984). Contemporaneamente i ROS svolgono un ruolo importante nella maturazione e nella capacitazione spermatica perché fungono da accettori di idrogeno per la glutazione perossidasi, durante l'addensamento della cromatina negli spermatozoi (Aitken et al., 1998). Quindi per mantenere le attività fisiologiche nel seme è necessario un perfetto equilibrio tra i ROS che vengono prodotti e quelli che vengono eliminati (Drevet, 2006), altrimenti le cellule spermatiche possono andare incontro da una parte ad alterata maturazione e dall'altra a danni ossidativi che ne riducono funzione e motilità. Esistono sistemi sia intra- che extracellulari, enzimatici e non, che prevengono la formazione dei ROS e che fungono quindi da antiossidanti. Sia gli spermatozoi che il plasma seminale contengono superossido dismutasi (SOD), glutazione riduttasi (GR), glutazione perossidasi

(GPx), con i suoi substrati glutatione ridotto e glutatione ossidato (GSH and GSSG), e catalasi (CAT) (Storey et al., 1998). Le catalasi proteggono il seme quando si trova a livello di lume dell'epididimo, mentre superossido dismutasi e glutatione perossidasi, prodotte dalle vescichette seminali, proteggono il seme dopo l'eiaculazione (Zubkova et al., 2004). Le superossido dismutasi agiscono trasformando gli O_2^- in O_2 e H_2O_2 mentre le catalasi convertono l' H_2O_2 a O_2 e H_2O (Alvarez et al., 1987). Il glutatione, substrato per gli enzimi glutatione perossidasi e glutatione transferasi, è presente nel plasma seminale in alte concentrazioni. Esso funge da donatore di elettroni e può interagire direttamente con H_2O_2 , O_2^- , $-OH$, radicali alcossilici e idroperossidi (Lenzi et al., 1996). La glutatione perossidasi agisce formando GSH a partire da GSSG.

Oltre agli antiossidanti propriamente detti, il plasma seminale contiene albumina, che è in grado di assorbire i perossidi lipidici e contribuisce in tal modo a proteggere sia la membrana che la motilità spermatica (Alvarez et al., 1995).

1.1.1.7 Ormoni

Nel liquido seminale è stata riscontrata la presenza di estrogeni (E), progesterone (P), testosterone (T), ormone luteotropo (LH), prolattina (PRL) e prostaglandine (PG). Gli ormoni steroidei e le prostaglandine sono prodotti dalle cellule del Leydig nel testicolo, dall'epididimo, dalle vescichette seminali, dalla prostata e dagli spermatozoi stessi (Hess et al., 2001). Le concentrazioni variano da specie a specie. Nell'ariete il plasma seminale contiene una minor quantità di estrogeni e testosterone rispetto al toro, mentre i livelli di prostaglandine (PGE) sono più elevati. È risaputo che le prostaglandine, la cui concentrazione è legata al periodo stagionale (Shore et al., 2003), stimolano nelle pecore la contrattilità della cervice favorendo la risalita degli spermatozoi (Gustafsson et al., 1977) e sono positivamente correlate con la fertilità (Dimov et al., 1977). Le specifiche funzioni di prolattina, ormone luteotropo, estrogeni e testosterone non sono conosciute ma si è riscontrata una correlazione negativa tra la concentrazione di prolattina immunoreattiva e motilità e vitalità del seme (Sidhu et al., 1992).

Henricks et al. (1998) hanno dimostrato la presenza anche di un altro ormone, l'IGF-I (Insulin-like Growth Factor I), nel plasma seminale di toro. Questo ormone viene sintetizzato nelle cellule del Leydig e del Sertoli, sotto il controllo di FSH ed LH (Lejeune et al., 1996). L'IGF-I è un polipeptide che probabilmente funge da fattore chemiocinetico, necessario per un normale sviluppo delle cellule germinali ed una corretta morfologia degli spermatozoi (Glander et al., 1996). A livello di regione acrosomiale di spermatozoi non ancora capacitati sono presenti dei recettori per l'IGF-I e questo fa pensare che l'ormone in questione abbia un ruolo negli eventi pre-fertilizzazione. Miao et al. (1998) hanno infatti ipotizzato che favorisca l'incremento della velocità lineare e la diminuzione della larghezza della testa degli spermatozoi, entrambe caratteristiche importanti perché il seme possa superare le barriere mucosali che si trovano nel tratto genitale femminile e attraversare la zona pellucida (Suarez et al., 1992).

1.1.1.8 Citochine

Le citochine sono state riconosciute come fattori antinfiammatori fondamentali del plasma seminale. Nel seme di toro sono state isolate diverse citochine: le interleuchine 6 e 10 (IL-6 e IL-10) ed il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) (Vera et al., 2003). L'IL-10 ha il compito di mantenere l'equilibrio immunologico nel seme ed evitare il rigetto degli spermatozoi. Il TNF α , prodotto dalle vescichette seminali sotto lo stimolo del testosterone (Robertson et al., 2002), agisce sia come pro-infiammatorio sia come regolatore negativo della risposta all'infiammazione (Hodge-Dufour et al., 1998).

1.1.1.9 Vescicole di membrana

Nel plasma seminale sono presenti delle vescicole di membrana ma la loro origine ed il meccanismo con cui vengono rilasciate nel seme non sono ancora noti. Questi organelli potrebbero avere un effetto positivo sulla motilità progressiva degli spermatozoi e, tramite

il loro legame alla superficie spermatica, probabilmente agiscono sulla capacitazione e sulla reazione acrosomiale (Fabiani et al., 1994). In ogni caso sono necessarie maggiori ricerche.

1.2 Il plasma seminale nei camelidi, con particolare riferimento agli alpaca (*Lama pacos*)

Il plasma seminale negli alpaca è tutt'oggi in fase di studio e le conoscenze accumulate sono ancor più scarse che negli altri animali. Una caratteristica peculiare del seme dei camelidi in generale è l'elevatissima viscosità. Questa particolarità rende difficile la valutazione, la diluizione e la conservazione del seme, e per tale motivo, in aggiunta alle difficoltà di raccolta del seme stesso, l'inseminazione artificiale negli alpaca è stata fin'ora quasi impraticabile su larga scala. L'origine, la composizione e la funzione della componente viscosa del liquido seminale è ancora sconosciuta e solamente alcuni costituenti biochimici sono stati individuati (El-Manna et al., 1986; Garnica et al., 1993, Mosaferi et al., 2005). Ciò evidenzia l'importanza del proseguimento degli studi in questo ambito e l'interesse, anche economico e sociale, che ne consegue.

1.2.1 Componenti biochimici

1.2.1.1 Proteine

Lo studio delle proteine nel plasma seminale dei camelidi è stato maggiormente incentrato su una particolare frazione proteica, con caratteristiche GnRH simili (Paolicchi et al., 1999; Pan et al., 2001, Adams et al., 2005), chiamato fattore inducente l'ovulazione (OIF). Ricerche effettuate sul seme di cammello hanno portato ad ipotizzare che l'OIF sia

formato da tre sub-strati: lo strato più esterno è costituito da una glicoproteina di 19,431 kDa, quello intermedio è formato da una proteina alcalina di 19,000 kDa ed il più interno da una proteina acida di 13,188 kDa (Pan et al., 2001). Lo studio di tale fattore è particolarmente importante per riuscire a definire meglio le peculiarità riproduttive di queste specie, dato che sono ad ovulazione indotta.

1.2.1.2 Ioni

Uno studio di Agarwal et al. (2004) mette in evidenza, nel dromedario, che le concentrazioni di sodio e potassio, riscontrabili nel plasma seminale e nel plasma ematico (BP), sono molto simili tra loro. Si può ipotizzare che la funzione di questi cationi nel plasma seminale sia quindi la stessa che nel plasma ematico, ovvero mantenere l'equilibrio elettrolitico ed osmotico, permettendo agli spermatozoi di sopravvivere nel liquido in cui sono immersi.

Nel liquido seminale di alpaca il catione più rappresentato è il calcio, mentre, per quanto riguarda gli anioni, il più presente è il cloro (Garnica et al, 1993). Si può riscontrare anche una certa quantità di fosfato inorganico, che potrebbe derivare dalla gliceril-fosforil-colina e dalla fosforil-colina (Dawson et al., 1957).

1.2.1.3 Zuccheri riducibili

Nei camelidi, sia del vecchio che del nuovo mondo, le concentrazioni di fruttosio nel plasma seminale sono molto basse, a causa dell'assenza delle vescichette seminali. In questi animali la maggior sorgente di fruttosio è il corpo della prostata, con un minor contributo da parte di ghiandole bulbo-uretrali, ampolla del dotto deferente e pars disseminata della prostata (El-Manna et al., 1986). Lo zucchero principale è il glucosio, che viene trasformato in fruttosio tramite fosforilazione, grazie all'azione di sorbitolo deidrogenasi e aldoso riduttasi (Agarwal et al., 2004). La concentrazione di glucosio risulta essere molto più elevata negli animali giovani (Garnica et al., 1993).

1.2.1.4 Profilo lipidico

Garnica et al. (1993) hanno quantificato i lipidi ed i fosfolipidi nel plasma seminale di alpaca. La loro funzione non è ancora stata chiarita ma probabilmente hanno un ruolo nella maturazione e nel mantenimento dell'integrità di membrana.

Studi riguardanti i camelidi del Vecchio Mondo hanno messo in evidenza una concentrazione di colesterolo più bassa che negli altri animali. Considerando il ruolo che il colesterolo ha nella stabilità di membrana, queste minori concentrazioni potrebbero essere alla base della difficoltà di conservazione del seme nei camelidi (Agarwal et al., 2004).

Obiettivo di questa tesi è proporre uno studio bio-chimico del plasma seminale di alpaca, con particolare attenzione alla componente proteica, in relazione a diverse sessioni di alimentazione controllata (per quattro periodi in totale). Fine ultimo della ricerca è l'eventuale riscontro di una connessione tra il tipo di alimento somministrato, le caratteristiche fisiche e le caratteristiche bio-chimiche del seme prelevato.

CAPITOLO II

Materiali e metodi

Il lavoro per questa tesi si è svolto in due momenti fondamentali: in un primo momento è stato svolto un lavoro di campo, con lo scopo di addestrare gli animali, prelevare il seme ed il sangue ed effettuare misure testicolari e del BCS, mentre in un secondo momento si è svolta la parte di laboratorio, con l'effettuazione degli esami biochimici ed elettroforetici.

2.1 Prelievo del seme

2.1.1 Animali

Il gruppo di animali che è stato utilizzato per la ricerca è costituito da sette alpaca in totale, cinque maschi e due femmine interi. Gli individui sono stati scelti casualmente tra diverse fasce d'età e provengono tutti dall'Azienda Agricola Poggio Piero (Montemassi, GR), di proprietà del Sig. Renè Steiger. I maschi appartengono ad un gruppo di animali eliminati dalla riproduzione per caratteristiche non considerate idonee dall'allevatore per il miglioramento genetico degli animali da fibra. Le generalità dei soggetti sono illustrate nella Tabella n°2.

Tabella n° 2. Nome e numero di riferimento, sesso, data di nascita e fenotipo degli animali utilizzati nella ricerca.

Nome	Numero	Sesso	Data di nascita	Fenotipo
Nerone	1	♂	12 - 09 - 2001	Huacaya
Rubens	2	♂	30 - 09 - 2004	Huacaya
Schumi	3	♂	11 - 09 - 2004	Huacaya
Enrico	4	♂	14 - 05 - 2001	Huacaya
El Mariachi	5	♂	27 - 09 - 2003	Suri
Medea		♀	02 - 06 - 2000	Huacaya
Lady		♀	15 - 12 - 2006	Huacaya

Gli animali sono stati stabulati in box separati, uno per i maschi ed uno per le femmine, senza possibilità per i maschi di vedere od odorare le femmine. Il contatto tra i due gruppi è avvenuto solamente durante le sessioni di raccolta del seme.

I maschi, vergini, sono stati gradualmente addestrati alla monta ed al prelievo del seme con vagina artificiale, utilizzando le due femmine come teaser. La presenza di due femmine ha permesso di poter procedere con l'addestramento e lo studio anche quando una delle due era temporaneamente non recettiva. Ciascun maschio veniva portato al luogo di monta separatamente dagli altri ed abituato alla vagina artificiale. L'impossibilità di utilizzare un manichino ha portato all'effettuazione del prelievo di seme direttamente tramite salto sulla femmina e gli animali sono stati abituati alla presenza ed ai movimenti degli operatori, che sono rimasti gli stessi per tutta la durata della ricerca.

Segni d'eccitamento sono stati mostrati fin dall'inizio, indicando una buona libido da parte dei maschi. I segnali presi in considerazione sono stati l'alzare e l'abbassare

frequentemente la coda, il tremolare delle orecchie e la vocalizzazione, come suggerito da Novoa (1970). La particolare vocalizzazione, mantenuta in maniera più o meno costante nei diversi maschi durante la monta, viene definita come “orgling”. È un suono gutturale che sembra avere una parte attiva nello stimolo del rilascio dell’LH precedente l’ovulazione (Bravo, 1994).

La normale posizione di copula negli alpaca è di tipo sternale: quando il maschio effettua il salto, la femmina si mette in posizione sternale, con gli arti raccolti sotto di sé (Fernandez-Baca et al., 1970; England et al., 1971) ed il maschio assume la posizione copulatoria, con gli arti anteriori che si portano sopra le spalle della femmina ed i metatarsi che toccano il terreno e sostengono il peso del corpo (Novoa, 1970). (Vedi Figura n°1). A penetrazione avvenuta, la pelvi del maschio è molto vicina a quella della femmina (Fowler, 1998). Gli animali sono stati considerati pronti ed addestrati quando tutti e cinque, ciascuno con le proprie particolarità, hanno assunto una posizione corretta di copula, cercando la vagina artificiale per effettuare la penetrazione e tollerando le manualità dell’operatore (vedi Figura n°2).



Figura n° 1. Posizione copulatoria di tipo sternale. Gli animali usati in questo studio mantengono una posizione leggermente più arretrata del normale a causa dello spazio occupato dalla vagina artificiale.



Figura n° 2. Gli animali sono stati abituati a penetrare la vagina artificiale ed a sopportare la vicinanza e le manualità di un operatore.

Il luogo scelto per la monta è dotato di pavimento antiscivolo ed è posto in una zona tranquilla degli stabulari, in modo da mantenere gli animali in un ambiente silenzioso e confortevole, sempre comunque con un accesso visivo all'esterno.

2.1.2 Vagina artificiale modificata

La vagina artificiale utilizzata è stata modificata, in parte come suggerito da Bravo et al. (1997a, 2000) (vedi Figura n°3), per mimare la presenza della cervice, necessaria a riprodurre una copula più naturale possibile. Gli alpaca, infatti, durante la monta, depositano direttamente il seme in entrambi i corni dell'utero, tramite lievi movimenti a stoccata (Franco et al., 1981; Bravo, 1994, 2002) e probabilmente il passaggio del pene attraverso il restringimento cervicale stimola l'eiaculazione, che avviene più volte (Lichtenwalner et al., 1996a,b). La struttura complessiva della vagina artificiale è formata da un tubo in PVC di 11.5 cm di lunghezza e 4.8 cm di diametro, cui è fatta passare all'interno una guaina di gomma, risvoltata e fermata alle estremità del tubo rigido, in modo da creare una camera interna tra la guaina stessa ed il tubo. Raggiunge, dopo l'inserimento della guaina di gomma una lunghezza di 15.5 cm. La camera interna viene riempita con acqua calda, ad una temperatura costante di 42°C, e successivamente insufflata, in modo da creare un certo grado di pressione sulle pareti. Nella parte craniale, sempre a livello di camera interna, è stato sistemato un anello di gommapiuma di 1.5 cm di diametro e 3 cm di larghezza, per simulare la cervice. L'intera parte di guaina morbida, che fuoriesce dal tubo rigido e contenente anche la falsa cervice, viene inserita ed assicurata ad un provettone di vetro che serve per la raccolta del seme (vedi Figure n°4 e

n°5), e la vagina artificiale modificata raggiunge una lunghezza finale di 26.2 cm. Solo alla fine della monta il seme viene trasferito in normali provette graduate e mantenuto ad una temperatura di 37°C. Inizialmente si è provato ad utilizzare una guaina in lattice, cui veniva alla fine assicurata una provetta, ma la lunga durata dell'accoppiamento e l'alta viscosità del seme portavano ad un contatto troppo prolungato degli spermatozoi con il lattice, che risultava tossico, mentre il vetro si comporta da materiale inerte. All'inserimento della guaina morbida nel provettone si è sempre cercato di imprimere un movimento rotatorio in senso orario, in modo da creare nella guaina stessa delle pieghe a spirale che imitassero ancora una volta la cervice. In questa specie infatti la cervice presenta due o tre pieghe a spirale (Sumar & Adams, 2007) ed il maschio imprime al pene, che possiede un glande di tipo cartilagineo e di forma uncinata (Sumar, 1983; Elwishy, 1988), un movimento spiralato (vedi Figura n°6). Il processo cartilagineo probabilmente aiuta a dirigere il pene attraverso la cervice (Johnson, 1989; Bravo, 1995; Fowler, 1998), a disperdere il seme nell'utero (Smith, 1999b) ed inoltre stimola meccanicamente l'ovulazione (Bakker et al., 2000). Per mantenere la temperatura per tutto il tempo necessario, la vagina completata viene inserita in una fodera isolante al cui interno c'è della lana e all'esterno del cuoio, e poi il tutto è avvolto in un tappetino termico.

Figura n° 3. Riproduzione schematica della vagina artificiale modificata suggerita ed utilizzata da Bravo et al. (2000) per la raccolta del seme nei cammelli.

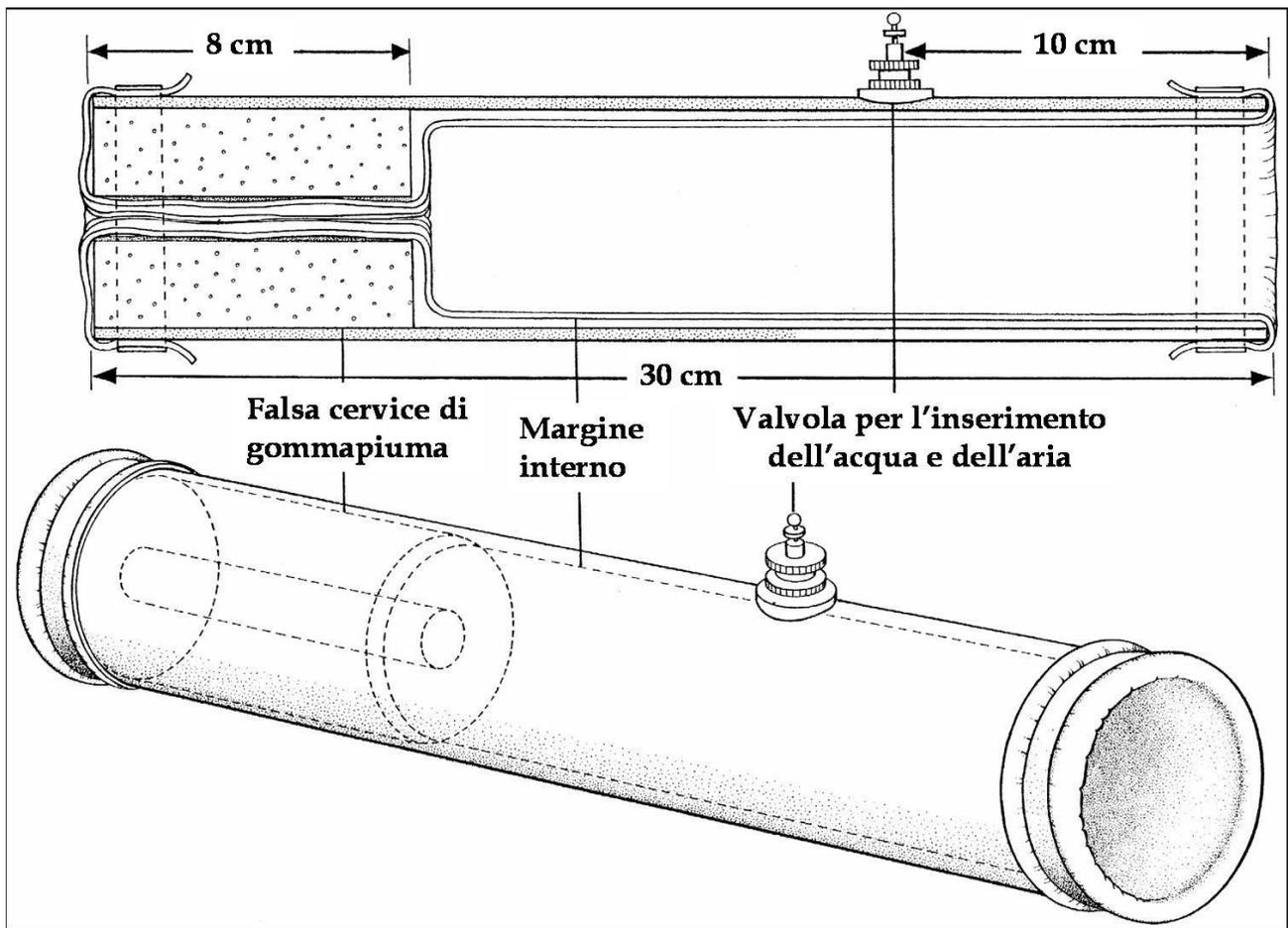


Figura n° 4. Modificazione apportata alla vagina artificiale utilizzata da Bravo et al. (2000). La guaina morbida fuoriesce dal tubo rigido di PVC per una lunghezza di 4 cm, ed all'interno di questa è posto l'anello di gommapiuma simulante la cervice.



Figura n° 5. Come appare la vagina artificiale utilizzata, al termine del montaggio.



Figura n° 6. Sfoderamento del pene e caratteristico movimento spiralato.

La fase di addestramento degli animali è coincisa con l'affinamento delle caratteristiche strutturali della vagina artificiale, fino ad un esplicito gradimento da parte dei maschi. Si è avuta conferma della qualità della vagina artificiale usandola per prelevare il seme a cinque alpaca regolarmente usati come stalloni riproduttori, nello stesso allevamento di provenienza degli animali sottoposti a studio, dove l'inseminazione delle femmine avviene abitualmente tramite monta naturale.

2.1.3 Standardizzazione dei prelievi di seme

Il periodo di addestramento è servito per stabilire con precisione il protocollo da seguire durante la fase di monitoraggio propriamente detta. Il seme è stato raccolto una volta la settimana, sempre nel medesimo giorno e, preferenzialmente, durante le ore mattutine. Una volta preparata la vagina artificiale, il maschio veniva portato dalla femmina, in attesa nel luogo prestabilito. Gli animali non sono mai stati forzati e la monta è sempre avvenuta secondo il tempo deciso dal maschio e con accettazione da parte della femmina. Ciascuna sessione di prelievo è stata cronometrata, prendendo il tempo da quando il maschio effettuava la penetrazione, finché non si alzava volontariamente.

2.1.4 Periodi a diversa alimentazione

Il fine della Tesi è quello di studiare le variazioni fisiche e chimiche, e quindi qualitative, del seme, in relazione a variazioni della dieta. Per questo motivo i maschi sono stati sottoposti a quattro periodi, di sei settimane ciascuno, a diversa alimentazione. Le prime due settimane di ciascun periodo sono servite da adattamento per il passaggio da una dieta all'altra, in modo da non sottoporre gli animali a cambiamenti troppo repentini. Durante le altre quattro settimane è stato effettuato il prelievo di seme, come indicato precedentemente. I prelievi effettuati nelle prime due settimane sono serviti esclusivamente a collezionare il plasma seminale, mentre nelle ultime due settimane, il seme, in caso raggiungesse parametri adeguati, è stato congelato. Le diete prese in considerazione sono state: solo fieno, fieno e pascolo, pascolo e mangime per ovini, pascolo e mangime per cavalli. La suddivisione in periodi e le corrispettive diete associate sono mostrati nella Tabella n°3.

Tabella n° 3. Elenco dei periodi sperimentali a diversa alimentazione con le corrispettive diete associate.

Periodo	Data settimane	Dieta
1	02/03/09 - 12/04/09	Fieno
2	13/04/09 - 24/05/09	Pascolo + Fieno
3	25/05/09 - 05/07/09	Pascolo + Mangime Ovini
4	06/07/09 - 16/08/09	Pascolo + Mangime Cavalli

Il fieno è di prato polifita, di qualità medio alta, ed è stato somministrato ad libitum. Il pascolo è sempre di tipo polifita ed è stato possibile far ruotare gli animali su tre diversi appezzamenti, in modo da avere sempre un buon foraggio. Entrambi i mangimi presi in considerazione si presentano in forma di pellets, con aggiunta di frammenti di mais ed orzo fioccati, di avena e di carrube in quello per cavalli. La loro composizione e le caratteristiche nutritive sono elencate nelle Tabelle n°4 e n°5. Il mangime per cavalli è

risultato essere più appetibile per gli alpaca, i quali lo hanno preferito a quello per ovini, che erano soliti mangiare in allevamento. L'acqua è sempre stata fornita ad libitum.

Tabella n° 4. Elenco delle generalità, della composizione, delle integrazioni e dei tenori analitici del mangime complementare per ovini usato nella ricerca.

Nome commerciale	Compli sheep, mangime complementare per ovini e caprini
Composizione	Farina d'orzo, farina di mais, f.e. di girasole, germe di mais, crusca di frumento tenero, farinaccio di grano tenero, f.e di soia, calcio carbonato, melasso di canna da zucchero, aromi
Integrazioni (per kg di mangime)	E972 vitamina A protetta 25.000 UI, colina cloruro 62 mg, E971 vitamina D3 protetta 2.500 UI, acido D-pantotenico 3 mg, vitamina E (alfatocoferolo 91%) 31 mg, E1 ferro (solfato ferroso eptaidrato) 18.5 mg, vitamina K (M.S.B, menadione sodium bisulfite) 1.5 mg, E2 iodio (ioduro di potassio) 1.5 mg, vitamina B1 1.5 mg, E3 cobalto (nitrato di cobalto) 0.8 mg, vitamina B2 0.3 mg, E5 manganese (ossido di manganese) 37 mg, vitamina B6 0.6 mg, E6 zinco (ossido di zinco) 37 mg, vitamina B12 0.01 mg, E8 selenio (selenito di sodio) 0.2 mg, vitamina PP 100 mg
Tenori analitici	Umidità 12%, proteina grezza 16%, lipidi grezzi 2.7%, fibra grezza 10%, ceneri grezze 7%

Tabella n° 5. Elenco delle generalità, della composizione, delle integrazioni e dei tenori analitici del mangime complementare per cavalli usato nella sperimentazione.

Nome commerciale	Equibase 44, mangime complementare per cavalli
Composizione	Cruschello di frumento, granoturco vaporizzato e schiacciato, fiocchi di orzo integrale, carrube frantumate, paglia di frumento, farinaccio di frumento, pula vergine di riso, fiocchi di avena, carbonato di calcio da rocce calciche macinate, granoturco, melasso di barbabietola da zucchero, cloruro di sodio, f.e. di soia tostata. (tutti i derivati di soia e mais sono di origine OGM)
Integrazioni (per kg di mangime)	Vitamina A protetta 8101 UI, vitamina D3 protetta 556 UI, vitamina E (alfatocoferolo 91%) 6 UI
Tenori analitici	Umidità 13%, proteina grezza 12%, lipidi grezzi 3%, fibra grezza 11%, ceneri grezze 7.5%

2.1.5 Annullamento delle interferenze legate alle diverse temperature stagionali

Considerando che i quattro periodi a diversa alimentazione si sono svolti in un intervallo di tempo molto ampio, bisogna tener presente che la temperatura ambientale è variata considerevolmente. A marzo 2009 la media delle temperature minime giornaliere è stata di 3.3°C (12.9°C quella delle massime), mentre la media delle temperature massime giornaliere di luglio è stata di 28.8°C. La media è diminuita nel mese di agosto, raggiungendo i 28.1°C, ma ci sono stati dei picchi che hanno raggiunto i 35°C (dati forniti dal Servizio Meteorologico dell'aeronautica Militare, stazione di Verona-Villafranca). Inoltre bisogna considerare che, nella zona in cui viene effettuata la ricerca, l'umidità relativa può raggiungere anche il 90%, e quindi la temperatura percepita è più alta di quella reale. Gli alpaca sono animali che si sono adattati a vivere sulle Ande, anche oltre altitudini di 4.000 metri slm, dove i raggi UV sono intensi ma le temperature salgono raramente sopra i 15°C.

Nei lama e negli alpaca i testicoli non sono penduli e si trovano appena al di sotto dell'arco ischiatico (vedi Figura n°7).



Figura n° 7. Nei camelidi sudamericani i testicoli si trovano appena al di sotto dell'arco ischiatico, molto vicini al corpo, e la cute a livello di scroto è spessa e grinzosa.

Questa vicinanza dei testicoli al corpo e lo spessore della pelle dello scroto, maggiore che negli altri animali, potrebbero essere due importanti adattamenti per prevenire la castrazione accidentale durante la stagione degli accoppiamenti, quando i maschi lottano tra loro (Fowler, 1998). Ma ciò rende i camelidi sudamericani particolarmente sensibili alle alte temperature. Schwalm et al. (2007) hanno dimostrato che la spermatogenesi viene inibita da temperature anche moderate, se lo stress da calore è persistente. Per questi

motivi sono stati messi a punto dei sistemi di raffrescamento, in modo da facilitare agli animali la termoregolazione. All'inizio del periodo caldo gli alpaca sono stati tosati. Il pascolo è stato fornito di un gazebo mobile, con conseguente possibilità per gli animali di ripararsi dal sole. Inoltre un getto d'acqua vaporizzata ha permesso loro di rinfrescarsi al bisogno e facilitare la dispersione di calore. Il luogo di stabulazione è fornito d'aria condizionata, quindi non sono stati necessari interventi. Questi accorgimenti hanno permesso di diminuire gli effetti negativi legati al caldo e di prevenire variazioni del livello individuale di spermatogenesi.

2.1.6 Valutazione e trattamento preliminari del seme dopo il prelievo

Al termine del prelievo il seme è sempre stato trasferito nelle provette graduate e riscaldate a 37°C. Nella valutazione preliminare sono stati presi in considerazione il volume, il colore e la viscosità del seme, la motilità percentuale e la concentrazione degli spermatozoi. Il volume è sempre stato calcolato in ml, in base alla graduazione delle provette. La viscosità è stata valutata facendo cadere delle gocce di liquido seminale su un vetrino, tramite una pipetta Pasteur. Ad un plasma seminale completamente liquido corrisponde il numero 3, ad uno semiliquido corrisponde il numero 2, mentre ad un plasma seminale viscoso si associa il numero 1 (Bravo et al., 1997b). La motilità e la concentrazione percentuali sono state calcolate tramite l'uso di una camera di conta chiamata Cell VU® Sperm Counting Chamber (vedi Figura n°8).

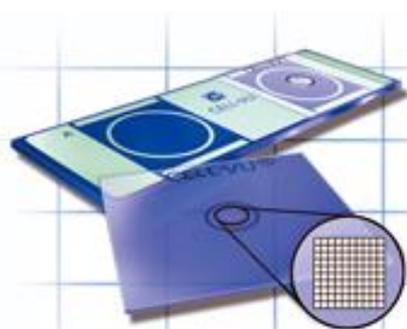


Figura n° 8. Cell VU® Sperm Counting Chamber.
(L'immagine è di proprietà di CellVU)

Cell VU® è una camera di conta preconfezionata fornita dall'AMI, Advanced Meditech International. È simile ad un emocitometro ma è stata scelta perché il seme non deve

essere diluito. La diluizione che sarebbe necessaria per la conta cellulare con un emocitometro rende difficile la conta stessa, perché l'alta viscosità del seme negli alpaca impedisce una distribuzione omogenea del diluente e degli spermatozoi. Con Cell VU® invece basta apporre 10 µl di seme senza diluizione sul vetrino e coprire con l'apposito coprioggetto. La camera di conta è costituita da un quadrato, formato a sua volta da 16 quadrati più piccoli. La procedura di conta consiste nel segnare gli spermatozoi motili e gli spermatozoi totali (motili + non motili) che si contano all'interno di cinque dei quadrati più piccoli. Il totale di spermatozoi motili va diviso per cinque e moltiplicato per dieci, per ottenere i milioni (10^6) di spermatozoi motili per ml. La stessa procedura va eseguita per il totale di motili + non motili.

ESEMPIO:

Quadrato	Spz motili	Spz motili + non motili
1	1	4
2	2	3
3	2	2
4	1	3
5	3	4
tot	9	16

$$9/5 \times 10 = 18 \times 10^6 \text{ spz motili/ml}$$

$$16/5 \times 10 = 32 \times 10^6 \text{ spz/ml}$$

Dopo essere stato sottoposto a valutazione preliminare, il seme è stato messo a centrifugare ad una velocità di 35 RPM per quaranta minuti. In questo modo si è ottenuta la separazione del plasma seminale dalla parte cellulare. Con una pipetta Pasteur si è prelevato il plasma per inserirlo in alcune heppendorf per poterlo congelare, in attesa dei successivi esami di laboratorio previsti.

Durante la terza e la quarta settimana di ciascun periodo i campioni di seme che sono stati reputati di adatta qualità, sono stati congelati. I parametri presi in considerazione sono stati una motilità maggiore del 50%, una concentrazione almeno pari a 20×10^6 e una viscosità pari ad 1. La soluzione base con cui poi diluire il seme da congelare è composta da TRIS (trisidrossimetilaminoetano), acido citrico, glucosio, penicillina, streptomina e acqua distillata. Una metà di questa prima soluzione è stata arricchita di tuorlo d'uovo ed altra acqua distillata ed è stata mantenuta ad una temperatura di 30°C, mentre la metà

restante è stata addizionata di tuorlo d'uovo e glicerolo ed è stata mantenuta ad una temperatura di 4°C. Ai campioni scelti per il congelamento è stata aggiunta immediatamente la soluzione mantenuta a 30°C, in quantità pari al campione stesso. A questo punto il campione è stato lasciato riposare per due ore a temperatura di refrigerazione (4°C). Al termine del tempo stabilito è stata aggiunta la soluzione contenente glicerolo, in quantità pari al campione già addizionato della prima soluzione, e successivamente il seme è stato raccolto in paliette e congelato, esponendolo a vapore di azoto liquido per cinque minuti. A questo punto i campioni sono stati introdotti nel bidone di azoto liquido e ivi conservati.

2.2 Prelievo di sangue

Per ogni giorno di prelievo del seme, agli animali è stato prelevato anche il sangue. Il prelievo è stato effettuato dalla giugulare e, per ciascun animale, sono state riempite una provetta con EDTA, per ottenere il plasma, e una provetta priva di anticoagulante, per ottenere il siero. I campioni di sangue così ottenuti sono stati messi a centrifugare a 35 RPM per dieci minuti. In questo modo si è ottenuta la separazione di plasma e siero dalla componente ematica cellulare. Plasma e siero sono a questo punto stati prelevati con una pipetta Pasteur e inseriti in alcune heppendorf per poter essere congelati, in attesa dei successivi esami di laboratorio previsti. Il nostro studio si propone di esaminare i parametri biochimici del plasma seminale in parallelo con i parametri biochimici del sangue, per poterne evidenziare differenze e similitudini nelle variazioni. Per gli esami di laboratorio è stato utilizzato il plasma ematico, ma, dove quest'ultimo si è rivelato insufficiente, si è potuto usare il siero.

2.3 Misure testicolari e BCS

Parallelamente ai prelievi di seme e di sangue, quindi una volta alla settimana, sono state effettuate sistematicamente le misure testicolari di tutti gli animali. E' stato utilizzato

un calibro metallico di precisione ed il metodo standardizzato ha previsto la misurazione della lunghezza, della larghezza e dello spessore, prima del testicolo destro e poi del testicolo sinistro. Le misure prese in esame sono servite per calcolare il volume testicolare. A tal fine è stata presa in considerazione la seguente formula dell'ellissoide: lunghezza x larghezza x spessore x 0,5236. Essa si basa sull'assunto che il testicolo abbia una forma ellissoide (Fuse et al., 1990; England, 1991; Chipkevitch et al., 1996; Diamond et al., 2000; Gumbsch et al., 2002) e ricerche dimostrano che risulta effettivamente la più accurata in caso di misurazioni eseguite tramite calibro (Gouletsou et al., 2008).

Sempre una volta la settimana sono stati valutati i BCS (Body Condition Score) dei soggetti. Il BCS negli alpaca viene valutato come nei piccoli ruminanti: si uniscono con la mano tesa i processi trasversi presenti a livello lombare con i processi spinosi delle stesse vertebre (vedi Figura n°9). Se la linea di congiunzione risulta dritta si associa un BCS pari a 2.5, ovvero un BCS medio su una scala da 1 a 5. Più la linea è concava, più il punteggio si avvicina ad 1 e l'animale è magro, mentre più la linea è convessa, più il punteggio si avvicina a 5 e l'animale è grasso. In condizioni di buona salute, il BCS non dovrebbe mai essere più basso di 2.5.

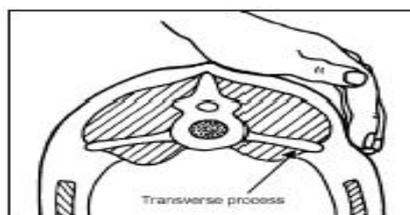


Figura n° 9. Metodo di misurazione del BCS nei piccoli ruminanti e camelidi sudamericani.
(Thompson & Meyer, 1994)

2.4 Esami di laboratorio

La parte di ricerca svolta in laboratorio ha previsto l'effettuazione sia di esami biochimici sul plasma seminale (SP) e sul plasma ematico (BP), sia di elettroforesi su gel di acrilammide per lo studio della componente proteica del plasma seminale. Il laboratorio di riferimento è stato quello interno al Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie della

Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Padova e si è stretta inoltre una collaborazione con il Laboratorio di Biotecnologie della Facoltà di Agraria dello stesso Ateneo, per quanto riguarda le varie prove relative all'elettroforesi.

2.4.1 Esame biochimico del plasma seminale (SP)

Per effettuare l'esame biochimico è stato scelto un campione di plasma seminale di ciascun animale, per ogni settimana dei quattro periodi a diversa alimentazione. Sono stati quindi esaminati un totale di ottanta campioni, sedici per ogni animale. Tutti i campioni sono stati esaminati, senza nessuna diluizione, tramite analizzatore automatico (Hitachi Boehring Mannheim, 912 Automatic Analyzer). Sono stati determinati i seguenti parametri biochimici: fosforo (P), magnesio (Mg), γ -glutammina transferasi (GGT), fosfatasi alcalina (ALP), glucosio (GLU), urea, creatinina (CRE), proteine totali (PT), calcio (Ca), alanina aminotransferasi (ALT), creatin-chinasi (CK), albumina (ALB), trigliceridi (TG) e colesterolo (COL).

2.4.2 Esame biochimico del plasma ematico (BP)

Anche per l'esecuzione dell'esame biochimico del plasma ematico è stato scelto un campione di ciascun animale, per ogni settimana di prelievo dei quattro periodi a diversa alimentazione. Quindi, anche in questo caso, sono stati valutati un totale di ottanta campioni, sedici per ogni animale. Nei casi in cui il plasma non sia risultato in quantità sufficiente, è stato utilizzato il siero. Tutti i campioni sono stati esaminati, senza nessuna diluizione, tramite analizzatore automatico (Hitachi Boehring Mannheim, 912 Automatic Analyzer). Sono stati valutati gli stessi parametri biochimici presi in considerazione per il plasma seminale, ovvero: fosforo (P), magnesio (Mg), γ -glutammina transferasi (GGT), fosfatasi alcalina (ALP), glucosio (GLU), urea, creatinina (CRE), proteine totali (PT), calcio (Ca), alanina aminotransferasi (ALT), creatin-chinasi (CK), albumina (ALB), trigliceridi (TG) e colesterolo (COL).

2.4.3 Esame elettroforetico delle proteine del plasma seminale

I campioni di plasma seminale delle prime due settimane di ogni periodo (quindi quaranta campioni totali) sono stati analizzati mediante elettroforesi monodimensionale in presenza di SDS (sodio dodecil solfato), come descritto da Laemmli (1970), utilizzando una cella elettroforetica Mini Proteans II (Bio-Rad). Inizialmente sono state effettuate delle prove con una concentrazione totale di acrilammide pari al 12%, così come riportato in letteratura per altre specie di interesse zootecnico (Scheit et al., 1988), ma le bande ottenute non erano ben distribuite e risultavano poco identificabili. Per tale ragione è stato scelto di utilizzare una concentrazione totale di acrilammide pari al 14%, che ci ha permesso di leggere più distintamente le diverse bande, ed in particolare quelle a basso peso molecolare. Un'ulteriore serie di corse elettroforetiche è stata eseguita su gel di acrilammide al 16%, per avere conforto dell'assenza di bande significative al di sotto di 21,5 kDa di peso molecolare, come da evidenze precedenti. Sono stati utilizzati dei campioni tal quale estratti con tampone Tris-HCl 1.33 M, SDS 8% e glicerolo 40%, raggiungendo un pH finale di 6.8 e una diluizione di 1:3. I campioni sono stati seminati prelevando una quantità variabile di plasma seminale ulteriormente diluito, in modo da raggiungere nei diversi pozzetti una quantità costante di proteina pari a 15 µg. Le diluizioni sono state effettuate sulla base dei valori di proteine totali trovati tramite gli esami biochimici: a valori compresi tra 0 e 10 si è applicata una diluizione di 1:5, a valori compresi tra 11 e 20 corrisponde una diluizione di 1:10 e a valori compresi tra 21 e 30 una diluizione di 1:20. La corsa elettroforetica è stata condotta a 48 mA/gel fino all'uscita dell'indicatore di corsa (blu bromofenolo). Come standard per il peso molecolare sono state utilizzate proteine a peso molecolare noto (Broad Molecular Weight standards, Bio-Rad) di: 200 kDa, 116.25 kDa, 97.4 kDa, 66.2 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21.5 kDa, 14.4 kDa e 6.5 kDa. Al termine della corsa i gel sono stati immersi per dodici ore in Blu di Comassie, un colorante specifico che si lega alle proteine e mette quindi in evidenza le bande a diverso peso molecolare. Un secondo passaggio, al fine di eliminare il colorante in eccesso, è stato eseguito immergendo i gel in acido acetico al 5% per altre dodici ore. Al termine di quest'ultima procedura i gel sono stati fotografati, appoggiandoli su un diafonoscopio, in modo da aumentare il contrasto tra le bande, e avendo cura di bagnare precedentemente la superficie.

Ciascuna foto è stata analizzata tramite i programmi per immagini Sante Dicom Viewer ed Image J. SDViewer è servito per calcolare le distanze delle diverse bande dal punto di partenza della corsa. Le distanze misurate per le bande standard ed il loro corrispettivo peso molecolare noto, sono serviti per ottenere delle equazioni lineari da cui trarre i pesi molecolari delle bande proteiche dei campioni seminati, a peso molecolare ignoto (dati corrispondenti a PM1-7). Image J invece ha fornito le basi per calcolare la densità delle varie bande, rapportando le misurazioni di ciascuna banda, ottenute secondo la scala di grigi utilizzata dal programma, con la somma di tutte le densità di ciascun pozzetto (dati corrispondenti a PT%1-7). Questi valori percentuali, divisi secondo fasce i cui estremi sono a peso molecolare noto (vedi Tabella n° 6), sono stati poi messi in relazione con i valori di proteine totali riscontrati nell'esame biochimico del liquido seminale (dati corrispondenti a PT1-7). In questo modo si può avere l'idea di come le proteine si distribuiscono all'interno delle fasce prese in considerazione.

Tabella n° 6. Estremi a peso molecolare noto delle fasce prese in considerazione per il calcolo delle distribuzioni proteiche. Proteine a peso molecolare maggiore di 200 kDa sono state inserite nella prima fascia, mentre proteine a peso molecolare inferiore a 14,4 kDa sono state inserite nella settima.

Fascia	Pesi molecolari (kDa)
1	200,00 - 116,25
2	116,25 - 97,40
3	97,40 - 66,20
4	66,20 - 45,00
5	45,00 - 31,00
6	31,00 - 21,50
7	21,50 - 14,40

2.5 Analisi statistiche

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando la procedura GLM del software SigmaStat 2.03 attraverso ANOVA per misure ripetute. Si sono ottenute, in un primo momento, delle analisi della varianza per dati ripetuti, con il periodo e la settimana come sorgenti di variazione, e come variabili dipendenti i parametri presi in considerazione per

i biochimici, l'analisi qualitativa del seme e l'analisi semiquantitativa dei gel di elettroforesi. In un secondo momento si è effettuata un'analisi della varianza per dati ripetuti, con il periodo e gli animali come sorgenti di variazione, e per variabili dipendenti le stesse dell'analisi precedente. Le significatività sono state valutate attraverso il test di Tuckey con $P < 0.05$. Inoltre sono stati calcolati gli indici di correlazione di Pearson, sia generali che per singolo soggetto, tra tutti i parametri valutati.

CAPITOLO III

Risultati

3.1 Biochimico del plasma ematico, per periodo e settimana

I valori dei risultati ottenuti dal biochimico del plasma ematico, sono stati suddivisi in valori dei macroelementi (P, Mg e Ca) (vedi Tabella n°7), valori enzimatici (GGT, ALP, ALT e CK) (vedi Tabella n°8), valori del profilo energetico (GLU, TG e COL), con confronto anche del BCS degli animali (vedi Tabella n°9), e valori delle componenti proteiche (Urea, CRE, PT e ALB) (vedi Tabella n°10).

Tabella n° 7. Valori dei macroelementi (media \pm ESM) presenti nel plasma ematico, nei quattro periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3 ° periodo	4 ° periodo
P (mg/dl)	1°	4,64 ± 0,58*	3,58 ± 0,58	4,36 ± 0,58	4,60 ± 0,58*
	2°	1,52 ± 0,58Φ a	2,20 ± 0,58 a	5,60 ± 0,58 b	6,96 ± 0,58Φ b
	3°	2,14 ± 0,58Φ a	2,44 ± 0,58 a	6,14 ± 0,58 b	5,22 ± 0,58*° b
	4°	2,20 ± 0,58Φ a	3,12 ± 0,58 ab	4,22 ± 0,58 ab	4,82 ± 0,58*° b
Mg (mg/dl)	1°	2,12 ± 0,17* a	3,04 ± 0,17 bc	2,81 ± 0,17 ac	2,23 ± 0,17 a
	2°	2,55 ± 0,17*	2,61 ± 0,17	2,89 ± 0,17	2,19 ± 0,17
	3°	3,45 ± 0,17Φ a	2,79 ± 0,17 ab	2,69 ± 0,17 b	2,22 ± 0,17 b
	4°	3,40 ± 0,21Φ a	2,48 ± 0,17 bc	2,67 ± 0,21 ac	2,40 ± 0,17 bc
Ca (mg/dl)	1°	8,85 ± 0,37	9,94 ± 0,37	9,15 ± 0,37	8,77 ± 0,37
	2°	9,80 ± 0,37	8,96 ± 0,37	9,56 ± 0,37	9,33 ± 0,37
	3°	9,37 ± 0,37	9,30 ± 0,37	9,33 ± 0,37	8,48 ± 0,37
	4°	8,68 ± 0,37	8,98 ± 0,37	9,38 ± 0,37	9,12 ± 0,37

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 8. Valori enzimatici (media ± ESM) presenti nel plasma ematico, nei quattro periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3 ° periodo	4 ° periodo
GGT (UI/l)	1°	12,60 ± 0,97	14,60 ± 0,97	13,40 ± 0,97	14,60 ± 0,97
	2°	13,20 ± 0,97	12,60 ± 0,97	15,60 ± 0,97	14,60 ± 0,97
	3°	13,20 ± 0,97	14,40 ± 0,97	15,00 ± 0,97	13,20 ± 0,97
	4°	11,20 ± 0,97 a	13,60 ± 0,97 ab	15,60 ± 0,97 b	13,80 ± 0,97 ab
ALP (UI/l)	1°	62,80 ± 8,09z	85,00 ± 8,09*	72,40 ± 8,09	88,80 ± 8,09
	2°	57,20 ± 8,09 a	81,60 ± 8,09* ab	88,00 ± 8,09 ab	97,60 ± 8,09 b
	3°	73,40 ± 8,09 a	121,00 ± 8,09Φ b	75,00 ± 8,09 a	80,00 ± 8,09 a
	4°	64,80 ± 8,09 a	105,60 ± 8,09* b	90,80 ± 8,09 ab	80,80 ± 8,09 ab
ALT (UI/l)	1°	13,40 ± 1,16 a	16,00 ± 1,16 a	21,40 ± 1,16 bc	18,00 ± 1,16 ac
	2°	12,40 ± 1,16 a	16,20 ± 1,16 ac	24,20 ± 1,16 b	20,00 ± 1,16 bc
	3°	12,60 ± 1,16 a	17,80 ± 1,16 b	24,00 ± 1,16 c	18,00 ± 1,16 b
	4°	13,80 ± 1,16 a	17,20 ± 1,16 ac	22,00 ± 1,16 b	18,60 ± 1,16 bc
CK (UI/l)	1°	142,60 ± 93,83	27,60 ± 93,83	40,60 ± 93,83	20,40 ± 93,83
	2°	86,20 ± 93,83	267,40 ± 93,83	364,80 ± 93,83	14,42 ± 93,83
	3°	32,20 ± 93,83	63,60 ± 93,83	41,80 ± 93,83	18,00 ± 93,83
	4°	41,20 ± 93,83	26,80 ± 93,83	234,40 ± 93,83	31,40 ± 93,83

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 9. Valori del profilo energetico (media ± ESM) presenti nel plasma ematico, e del BCS (media ± ESM), nei diversi periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3° periodo	4° periodo
GLU (mg/dl)	1°	97,20 ± 10,50	113,80 ± 10,50*	121,20 ± 10,50	118,00 ± 10,50 *°
	2°	108,80 ± 10,50	118,00 ± 10,50*°	117,20 ± 10,50	136,60 ± 10,50*
	3°	106,60 ± 10,50 a	157,60 ± 10,50Φ° b	127,40 ± 10,50 ab	92,80 ± 10,50Φ° a
	4°	104,40 ± 10,50	124,20 ± 10,50*°	125,20 ± 10,50	122,20 ± 10,50*°
TG (mg/dl)	1°	20,80 ± 2,45	23,60 ± 2,45	19,80 ± 2,45	20,80 ± 2,45
	2°	19,20 ± 2,45	18,60 ± 2,45	23,60 ± 2,45	26,80 ± 2,45
	3°	19,80 ± 2,45	19,00 ± 2,45	25,80 ± 2,45	16,20 ± 2,45
	4°	19,00 ± 2,45	16,20 ± 2,45	16,60 ± 2,45	19,20 ± 2,45
COL (mg/dl)	1°	28,20 ± 13,45	33,60 ± 13,45	22,60 ± 13,45	27,40 ± 13,45
	2°	30,40 ± 13,45	23,40 ± 13,45	31,20 ± 13,45	76,80 ± 13,45
	3°	37,40 ± 13,45	26,60 ± 13,45	24,40 ± 13,45	21,40 ± 13,45
	4°	33,80 ± 13,45	25,80 ± 13,45	33,80 ± 13,45	23,80 ± 13,45
BCS	1°	2,80 ± 0,09	2,95 ± 0,09	3,00 ± 0,09	2,90 ± 0,09*
	2°	2,80 ± 0,09	2,85 ± 0,09	2,90 ± 0,09	3,05 ± 0,09*°
	3°	2,85 ± 0,09	3,00 ± 0,09	3,10 ± 0,09	3,10 ± 0,09*°
	4°	3,00 ± 0,09 ab	2,85 ± 0,09 a	3,10 ± 0,09 ab	3,30 ± 0,09Φ° b

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 10. Valori delle componenti proteiche (media ± ESM) presenti nel plasma ematico, nei quattro periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3° periodo	4° periodo
Urea (mg/dl)	1°	27,92 ± 2,42 a	36,80 ± 2,42 * ab	46,36 ± 2,42 b	32,90 ± 2,42 *° a
	2°	32,68 ± 2,42 ac	45,10 ± 2,42 *° bc	49,86 ± 2,42 b	29,44 ± 2,42 * a
	3°	27,90 ± 2,42 a	48,28 ± 2,42 Φ° bc	44,18 ± 2,42 bc	37,64 ± 2,42 *° ac
	4°	24,52 ± 2,42 a	41,30 ± 2,42 *° b	50,54 ± 2,42 b	39,58 ± 2,42 Φ° b
CRE (mg/dl)	1°	2,26 ± 0,14* ac	2,42 ± 0,14* a	1,75 ± 0,14 bc	1,92 ± 0,14 ac
	2°	2,77 ± 0,14Φ° a	1,87 ± 0,14Φ° b	1,93 ± 0,14 b	1,84 ± 0,14 b
	3°	2,58 ± 0,14*° a	2,05 ± 0,14*° ac	1,74 ± 0,14 bc	1,82 ± 0,14 bc
	4°	2,28 ± 0,14*°	2,03 ± 0,14*°	1,94 ± 0,14	1,99 ± 0,14
PT (g/l)	1°	68,20 ± 2,83	74,20 ± 2,83	68,00 ± 2,83	67,60 ± 2,83
	2°	68,80 ± 2,83	67,40 ± 2,83	75,20 ± 2,83	69,40 ± 2,83
	3°	68,20 ± 2,83	69,20 ± 2,83	71,60 ± 2,83	64,60 ± 2,83
	4°	62,80 ± 2,83 a	68,40 ± 2,83 ac	74,80 ± 2,83 bc	70,00 ± 2,83 ac
ALB (g/l)	1°	36,12 ± 1,49	37,60 ± 1,49	36,92 ± 1,49	35,70 ± 1,49
	2°	36,24 ± 1,49	34,36 ± 1,49	38,72 ± 1,49	36,66 ± 1,49
	3°	35,76 ± 1,49	36,20 ± 1,49	37,74 ± 1,49	35,26 ± 1,49
	4°	33,58 ± 1,49	35,50 ± 1,49	39,10 ± 1,49	37,78 ± 1,49

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Per quanto riguarda i macroelementi si può vedere come il fosforo tenda ad aumentare significativamente nel secondo, nel terzo e nel quarto periodo, in coincidenza con

l'introduzione del foraggio fresco nella dieta. Il magnesio invece rimane abbastanza stabile nei primi due periodi ma tende a diminuire nel terzo e nel quarto periodo, con l'introduzione dei mangimi, prima per ovini e poi per cavalli. Il calcio, al contrario dei precedenti cationi, non presenta nessuna differenza significativa nei diversi periodi.

Dalle variazioni dei parametri enzimatici si evince come il cambio alimentare influenzi anche il metabolismo, soprattutto a livello epatico. La γ -glutammina transferasi raggiunge differenze significative nei quattro periodi solamente all'interno della quarta settimana, ma si può notare comunque un aumento generale dell'enzima, soprattutto in corrispondenza del secondo e del terzo periodo (dove si è avuta l'introduzione rispettivamente di foraggio fresco e mangime per ovini). La fosfatasi alcalina subisce un netto aumento con l'introduzione del foraggio fresco (secondo periodo) e successivamente tende a diminuire nel terzo e nel quarto periodo (introduzione dei mangimi), ma rimane pur sempre a valori più elevati del primo periodo (dieta con solo fieno). Anche l'alanina aminotransferasi tende ad aumentare nel secondo, terzo e quarto periodo ma raggiunge i valori più elevati in corrispondenza del terzo periodo, ovvero all'introduzione del mangime per ovini. La creatinasi ha invece un'alta variabilità sia nei diversi periodi che nelle diverse settimane ma queste differenze non sono significative.

Sotto il profilo energetico, il glucosio non subisce variazioni significative se non per un aumento evidente durante la terza settimana del secondo periodo. In linea più generale si può comunque notare come i valori tendano ad aumentare con l'introduzione del foraggio e dei mangimi rispetto alla dieta con solo fieno. I trigliceridi ed il colesterolo non subiscono invece alcuna variazione significativa all'interno dei diversi periodi. Il BCS non presenta differenze eclatanti, se non per una diminuzione significativa durante la quarta settimana del secondo periodo ed un aumento nella quarta settimana del quarto periodo rispetto alle precedenti settimane dello stesso periodo. In generale si può comunque notare come il BCS tendi ad aumentare dal primo al quarto periodo, con l'introduzione soprattutto dei mangimi nel terzo e quarto periodo.

Tra le componenti proteiche, l'urea presenta valori significativamente aumentati in concomitanza del secondo e del terzo periodo, ovvero dell'introduzione del foraggio fresco e del mangime per ovini. Per la creatinina notiamo valori più elevati, in modo

significativo, nel primo periodo (somministrazione agli animali di solo fieno), mentre proteine totali ed albumina non subiscono nessuna variazione.

3.2 Biochimico del plasma seminale, per periodo e settimana

I valori dei risultati ottenuti dal biochimico del plasma seminale, sono stati anch'essi suddivisi in valori dei macroelementi (P, Mg e Ca) (vedi Tabella n°11), valori enzimatici (GGT, ALP, ALT e CK) (vedi Tabella n°12), valori del profilo energetico (GLU, TG e COL) (vedi Tabella n°13) e valori delle componenti proteiche (Urea, CRE, PT e ALB) (vedi Tabella n°14).

Tabella n° 11. Valori dei macroelementi (media \pm ESM) presenti nel plasma seminale, nei diversi periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3 ° periodo	4 ° periodo
P (mg/dl)	1°	0,49 \pm 0,41*	0,73 \pm 0,31*	0,75 \pm 0,31	0,83 \pm 0,40
	2°	0,95 \pm 0,31* a	4,04 \pm 0,41 Φ b	0,43 \pm 0,31 a	0,73 \pm 0,40 a
	3°	0,63 \pm 0,41*	1,54 \pm 0,42*	0,51 \pm 0,54	0,05 \pm 0,31
	4°	3,81 \pm 0,89 Φ	0,41 \pm 0,41*	0,43 \pm 0,31	0,73 \pm 0,31
Mg (mg/dl)	1°	2,58 \pm 0,33	3,21 \pm 0,24*	3,43 \pm 0,24	2,31 \pm 0,32
	2°	3,30 \pm 0,25 a	5,05 \pm 0,45 Φ ° bc	3,36 \pm 0,24 ac	2,95 \pm 0,32 a
	3°	4,12 \pm 0,35 a	3,64 \pm 0,48*° ab	3,19 \pm 0,44 ab	2,38 \pm 0,24 b
	4°	3,22 \pm 0,70	3,52 \pm 0,32*°	3,70 \pm 0,24	2,67 \pm 0,24
Ca (mg/dl)	1°	11,05 \pm 1,41	11,79 \pm 1,62	14,01 \pm 1,35	9,64 \pm 1,35
	2°	10,82 \pm 1,03	18,30 \pm 3,19	13,88 \pm 1,03	12,23 \pm 1,37
	3°	10,67 \pm 1,39	20,38 \pm 2,46	15,12 \pm 1,91	12,06 \pm 1,03
	4°	14,94 \pm 2,98	9,27 \pm 2,42	13,09 \pm 1,03	13,05 \pm 1,03

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 12. Valori enzimatici (media \pm ESM) presenti nel plasma seminale, nei diversi periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3 ° periodo	4 ° periodo
GGT (UI/l)	1°	105,01 \pm 134,08	204,75 \pm 101,61	323,50 \pm 101,61	432,30 \pm 131,17
	2°	231,50 \pm 101,61	785,38 \pm 180,37	191,00 \pm 101,61	132,02 \pm 131,65
	3°	143,35 \pm 134,73	561,58 \pm 137,36	279,66 \pm 176,42	92,75 \pm 101,61
	4°	655,78 \pm 291,42	146,60 \pm 134,25	149,75 \pm 101,61	143,50 \pm 101,61
ALP (UI/l)	1°	279,70 \pm 221,28*	528,50 \pm 167,70*	408,50 \pm 167,70	707,29 \pm 216,48
	2°	664,50 \pm 167,70* ab	1650,75 \pm 297,67 Φ a	186,00 \pm 167,70 b	195,96 \pm 217,26 b

	3°	374,86 ± 222,35*	960,26 ± 226,68*°	674,07 ± 291,15	167,50 ± 167,70
	4°	2485,93 ± 480,94Φ a	219,70 ± 221,56* b	266,25 ± 167,70 b	213,25 ± 167,70 b
ALT (UI/l)	1°	11,64 ± 3,95	14,50 ± 3,01*°	13,50 ± 3,01	2,08 ± 3,88
	2°	8,25 ± 3,01 a	28,94 ± 3,98* b	6,25 ± 3,00 a	1,47 ± 3,86 a
	3°	7,67 ± 3,98	8,67 ± 4,15*°	15,43 ± 5,26	4,75 ± 3,00
	4°	20,94 ± 8,68	3,22 ± 3,95Φ°	9,00 ± 3,01	14,34 ± 4,03
CK (UI/l)	1°	0,64 ± 0,64	-	-	0,89 ± 0,62
	2°	-	0,78 ± 0,64	-	0,78 ± 0,62
	3°	0,71 ± 0,64	-	0,98 ± 0,85	0,25 ± 0,48
	4°	0,53 ± 1,40	1,14 ± 0,64	-	0,50 ± 0,65

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa (P<0,05). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa (P<0,05).

Tabella n° 13. Valori del profilo energetico (media ± ESM) nel plasma seminale nei diversi periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3° periodo	4° periodo
GLU (mg/dl)	1°	1,84 ± 0,54	1,75 ± 0,41	2,25 ± 0,41	1,35 ± 0,54
	2°	2,00 ± 0,41	1,87 ± 0,55	1,25 ± 0,41	0,84 ± 0,74
	3°	1,83 ± 0,55	2,41 ± 0,57	1,10 ± 0,73	1,25 ± 0,41
	4°	2,26 ± 1,18	2,29 ± 0,54	1,00 ± 0,41	0,80 ± 0,57
TG (mg/dl)	1°	20,40 ± 10,19*	58,50 ± 7,74°	22,75 ± 7,74	32,74 ± 10,15
	2°	38,25 ± 7,74* a	121,23 ± 10,41* b	10,75 ± 7,74 a	-
	3°	25,30 ± 10,36* ac	78,92 ± 10,74*° a	37,07 ± 13,81 ac	4,50 ± 7,74 bc
	4°	121,90 ± 22,47Φ a	13,38 ± 10,18Φ b	13,00 ± 7,74 b	-
COL (mg/dl)	1°	1,61 ± 1,15	2,30 ± 1,84	3,00 ± 0,83	-
	2°	2,00 ± 0,83	3,43 ± 1,18	0,20 ± 1,29	5,16 ± 4,24
	3°	0,80 ± 1,30	2,03 ± 1,22	-	-
	4°	2,46 ± 3,21	2,37 ± 1,53	0,85 ± 1,22	2,62 ± 2,11

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa (P<0,05). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa (P<0,05).

Tabella n° 14. Valori del profilo proteico (media ± ESM) nel plasma seminale, nei diversi periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3° periodo	4° periodo
Urea (mg/dl)	1°	18,59 ± 8,69	31,28 ± 6,60	41,35 ± 6,60	34,48 ± 8,50
	2°	41,58 ± 6,60	44,60 ± 8,66	63,75 ± 6,60	32,01 ± 8,47
	3°	39,00 ± 8,75	48,00 ± 8,92	47,42 ± 11,45	35,40 ± 6,60
	4°	39,28 ± 18,92	35,59 ± 8,66	46,85 ± 6,60	40,73 ± 6,60
CRE (mg/dl)	1°	-	0,31 ± 0,76	0,44 ± 0,76	0,91 ± 0,98
	2°	1,66 ± 0,76	-	1,48 ± 0,76	-
	3°	3,38 ± 1,00	-	0,11 ± 1,31	0,28 ± 0,96
	4°	0,79 ± 2,17	0,09 ± 0,99	0,10 ± 0,76	1,14 ± 0,76

PT (g/l)	1°	2,09 ± 3,27	3,00 ± 2,48	3,50 ± 2,48	3,70 ± 3,20
	2°	4,00 ± 2,48	13,01 ± 3,26	3,00 ± 2,48	12,08 ± 3,19
	3°	4,99 ± 3,29	4,75 ± 3,35	2,99 ± 4,31	3,00 ± 2,48
	4°	6,89 ± 7,11	2,08 ± 3,25	2,75 ± 2,48	6,75 ± 2,48
ALB (g/l)	1°	-	-	-	0,62 ± 0,18*°
	2°	-	-	-	0,30 ± 0,18*
	3°	-	0,06 ± 0,19 a	0,18 ± 0,25 a	1,00 ± 0,14Φ° b
	4°	-	0,08 ± 0,18	-	0,74 ± 0,19*°

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Nel plasma seminale, i valori di fosforo non mostrano differenze significative, tranne per la presenza di due picchi in corrispondenza della quarta settimana del primo periodo e della seconda settimana del secondo periodo. Il magnesio tende ad aumentare nel secondo e nel terzo periodo, con l'introduzione rispettivamente del foraggio e del mangime per ovini, anche se tale differenza risulta significativa solamente nella seconda settimana, mentre nella terza settimana la tendenza quasi si inverte ed i valori diminuiscono significativamente dal primo al quarto periodo. Il calcio si comporta come nel plasma ematico e non presenta variazioni significative nei diversi periodi.

I valori di γ -glutammina transferasi sono alquanto variabili in tutti i periodi all'interno delle diverse settimane ma le differenze non sono significative. Anche la fosfatasi presenta valori variabili ma differenze significative risiedono in un aumento netto del parametro nella quarta settimana del primo periodo e nella seconda settimana del secondo periodo. L'alanina transferasi presenta anch'essa un unico valore significativamente diverso, in corrispondenza della seconda settimana del secondo periodo. La creatinina non presenta invece alcuna differenza significativa.

Il glucosio non presenta nessuna differenza significativa. I trigliceridi invece presentano dei valori significativamente più elevati nella quarta settimana del primo periodo e nella seconda settimana del secondo periodo, mentre all'interno della terza settimana si vede una diminuzione significativa dal primo al quarto periodo. Il colesterolo, come il glucosio, non presenta variazioni significative.

I parametri di origine proteica, urea, creatinina e proteine totali non presentano differenze significative nei diversi periodi. Solamente l'albumina risulta avere un aumento significativo durante la terza settimana del quarto periodo.

Tutti i dati ottenuti dall'analisi dei valori del biochimico del plasma seminale sono stati analizzati per soli quattro animali, in quanto l'animale 2 (Rubens) presentava dei valori mancanti che non hanno permesso l'effettuazione dell'analisi stessa. Tali valori risultano assenti perché il seme di questo maschio ha sempre dimostrato una qualità tale da poter essere congelato nella terza e quarta settimana di raccolta, e quindi non è stato possibile recuperarne il liquido seminale. Inoltre per alcuni parametri, quali il calcio ed il magnesio, i valori erano talmente elevati da superare il limite della soglia massima calcolabile dall'analizzatore automatico (rispettivamente 16 mg/dl e 4,86 mg/dl).

3.3 Valutazione della qualità del seme, per periodo e settimana

I valori dei risultati ottenuti dalla valutazione dei parametri di qualità del seme sono mostrati nella Tabella n°15.

Tabella n° 15. Valori dei parametri qualitativi (media \pm ESM) presi in considerazione per la valutazione del seme, nei diversi periodi e nelle diverse settimane.

	Sett	1° periodo	2° periodo	3° periodo	4° periodo
Tempo di raccolta (min)	1°	19,20 \pm 1,22 a	14,20 \pm 1,22 bc	17,60 \pm 1,22 ac	15,00 \pm 1,22 ab
	2°	16,40 \pm 1,22	14,40 \pm 1,22	14,20 \pm 1,22	16,00 \pm 1,22
	3°	17,00 \pm 1,22	14,37 \pm 1,47	15,00 \pm 1,22	15,20 \pm 1,22
	4°	14,61 \pm 1,81	11,80 \pm 1,22	15,00 \pm 1,22	14,20 \pm 1,22
Viscosità	1°	2,00 \pm 0,26	2,00 \pm 0,26	1,80 \pm 0,26	2,00 \pm 0,26
	2°	2,00 \pm 0,26	2,00 \pm 0,26	1,60 \pm 0,26	2,60 \pm 0,26
	3°	1,80 \pm 0,26	1,87 \pm 0,32	2,00 \pm 0,26	1,80 \pm 0,26
	4°	1,84 \pm 0,39	1,80 \pm 0,26	2,00 \pm 0,26	1,80 \pm 0,26
Volume (ml)	1°	2,16 \pm 1,03	2,46 \pm 1,03	5,59 \pm 1,26	2,80 \pm 1,03
	2°	2,60 \pm 1,03	1,50 \pm 1,03	4,08 \pm 1,03	3,24 \pm 1,03
	3°	2,26 \pm 1,03	1,58 \pm 1,26	2,33 \pm 1,29	3,50 \pm 1,03
	4°	2,47 \pm 1,53 ab	1,40 \pm 1,03 a	2,86 \pm 1,03 ab	5,30 \pm 1,03 b
Motilità (%)	1°	36,25 \pm 8,84	30,21 \pm 11,12	30,00 \pm 8,84	20,00 \pm 8,84
	2°	48,75 \pm 8,84	43,75 \pm 8,84	17,75 \pm 8,84	25,00 \pm 8,84
	3°	17,75 \pm 8,84	33,75 \pm 8,84	28,75 \pm 8,84	35,00 \pm 8,84
	4°	40,00 \pm 8,84	33,75 \pm 8,84	28,75 \pm 8,84	17,50 \pm 8,84
Conc. Spermatica (x 10 ⁶)	1°	65,50 \pm 23,35*	52,76 \pm 30,14	10,70 \pm 23,35	4,26 \pm 23,35
	2°	157,75 \pm 23,35 Φ a	59,25 \pm 23,35 ab	8,00 \pm 23,35 b	13,25 \pm 23,35 b
	3°	128,03 \pm 23,35* \circ	115,79 \pm 30,14	44,70 \pm 23,35	5,88 \pm 23,35
	4°	191,75 \pm 23,35 Φ \circ a	43,25 \pm 23,35 b	31,15 \pm 23,35 b	28,63 \pm 23,35 b

Volume testicolare destro (cm ³)	1°	13,88 ± 1,23 ab	14,43 ± 1,23 ab	18,23 ± 1,23* a	12,80 ± 1,23 b
	2°	14,01 ± 1,23	15,03 ± 1,23	13,79 ± 1,23*°	13,40 ± 1,23
	3°	13,88 ± 1,23	12,34 ± 1,23	11,08 ± 1,23Φ°	13,46 ± 1,23
	4°	14,03 ± 1,23 a	15,08 ± 1,23 a	9,41 ± 1,23Φ° b	17,33 ± 1,23 a
Volume testicolare sinistro (cm ³)	1°	16,39 ± 1,46	14,38 ± 1,46	15,12 ± 1,46	11,53 ± 1,46*
	2°	13,70 ± 1,46	12,13 ± 1,46	11,90 ± 1,46	10,34 ± 1,46*
	3°	12,51 ± 1,46	13,93 ± 1,46	12,65 ± 1,46	15,25 ± 1,46*°
	4°	13,96 ± 1,46 ab	14,05 ± 1,46 ab	9,93 ± 1,46a	17,98 ± 1,46Φ° b

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (colonne) escludono una differenza significativa (P<0,05). Lettere uguali all'interno di ogni settimana per i diversi periodi (righe) escludono una differenza significativa (P<0,05).

Si può notare come il tempo di raccolta del seme sia rimasto abbastanza costante nei diversi periodi, anche se è presente una differenza significativa tra le prime due settimane del primo e del secondo periodo. La viscosità non ha presentato alcuna variazione, mentre per il volume, sebbene presenti una variazione significativa solamente nella quarta settimana del quarto periodo, si può evidenziare un certo aumento distribuito nel terzo e nel quarto periodo, in coincidenza con l'introduzione dei mangimi. I valori di motilità del seme non possiedono differenze significative ma si può vedere una diminuzione generale dal primo al quarto periodo, quindi con valori di motilità maggiori con alimentazione a solo fieno. Tale diminuzione dei valori dal primo al quarto periodo è mantenuta anche nei confronti della concentrazione del seme, ma in questo caso le differenze tra il primo periodo ed i successivi sono significative. I volumi testicolari rimangono pressoché costanti ma sono presenti un aumento significativo, solamente per il testicolo destro, nella prima settimana del quarto periodo e una diminuzione, sia per il testicolo destro che per il sinistro, nella quarta settimana del terzo periodo.

Per quanto riguarda la motilità percentuale e la concentrazione spermatica, è stato escluso dall'analisi l'animale 5 (El Mariachi) in quanto ha sempre dato un seme privo di spermatozoi.

3.4 Immagini dei gel di elettroforesi

Le foto dei gel di acrilammide ottenuti alla fine delle corse elettroforetiche sono presentate nelle Figure n°10, n°11, n°12, n°13 e n°14. In ogni gel, associato ad un singolo animale, sono presenti otto corse elettroforetiche, corrispondenti ai campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascun periodo.

Figura n° 10. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 14% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 1 (Nerone)



Figura n° 11. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 14% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 2 (Rubens)

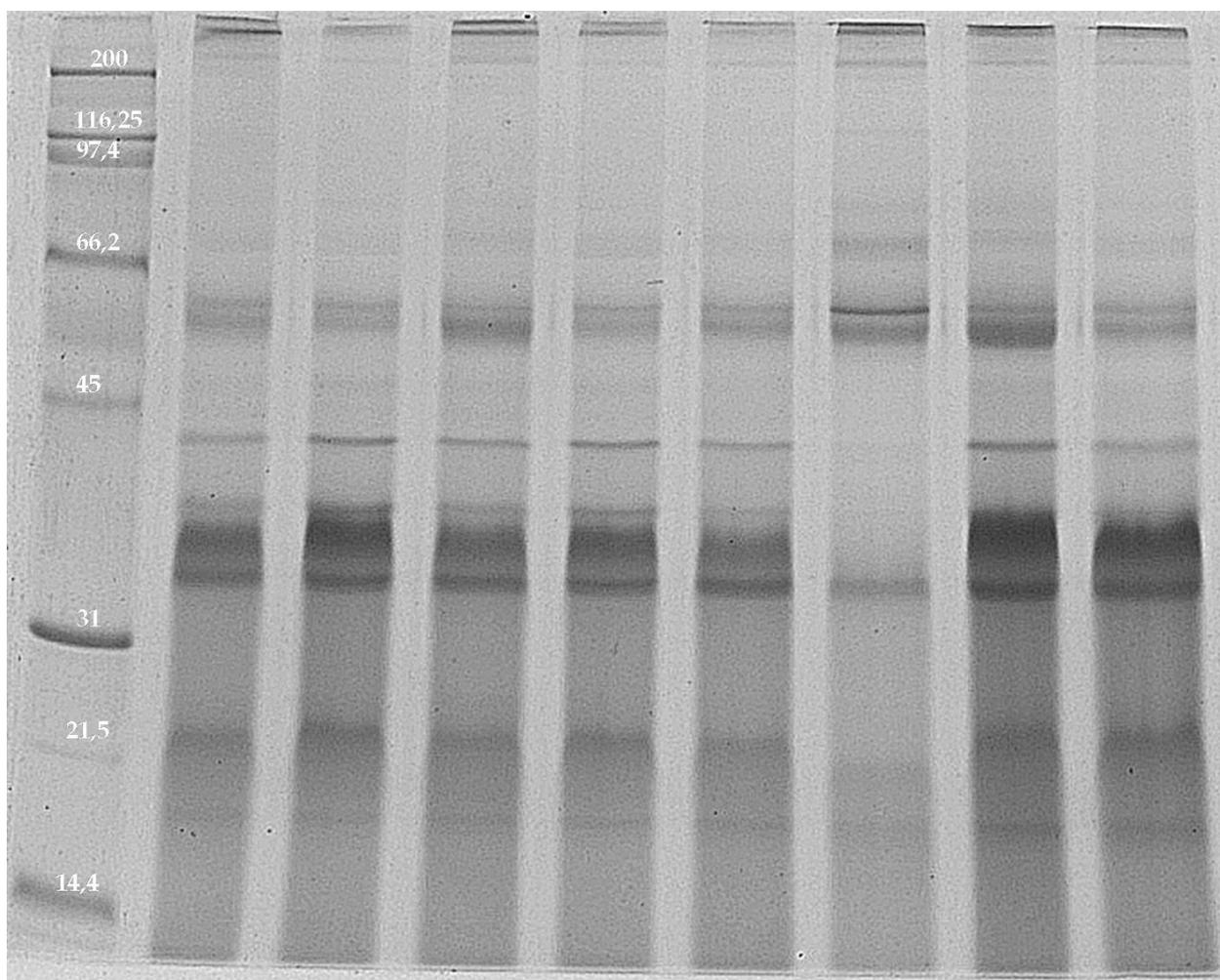


Figure n° 12. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 14% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 3 (Schumi).

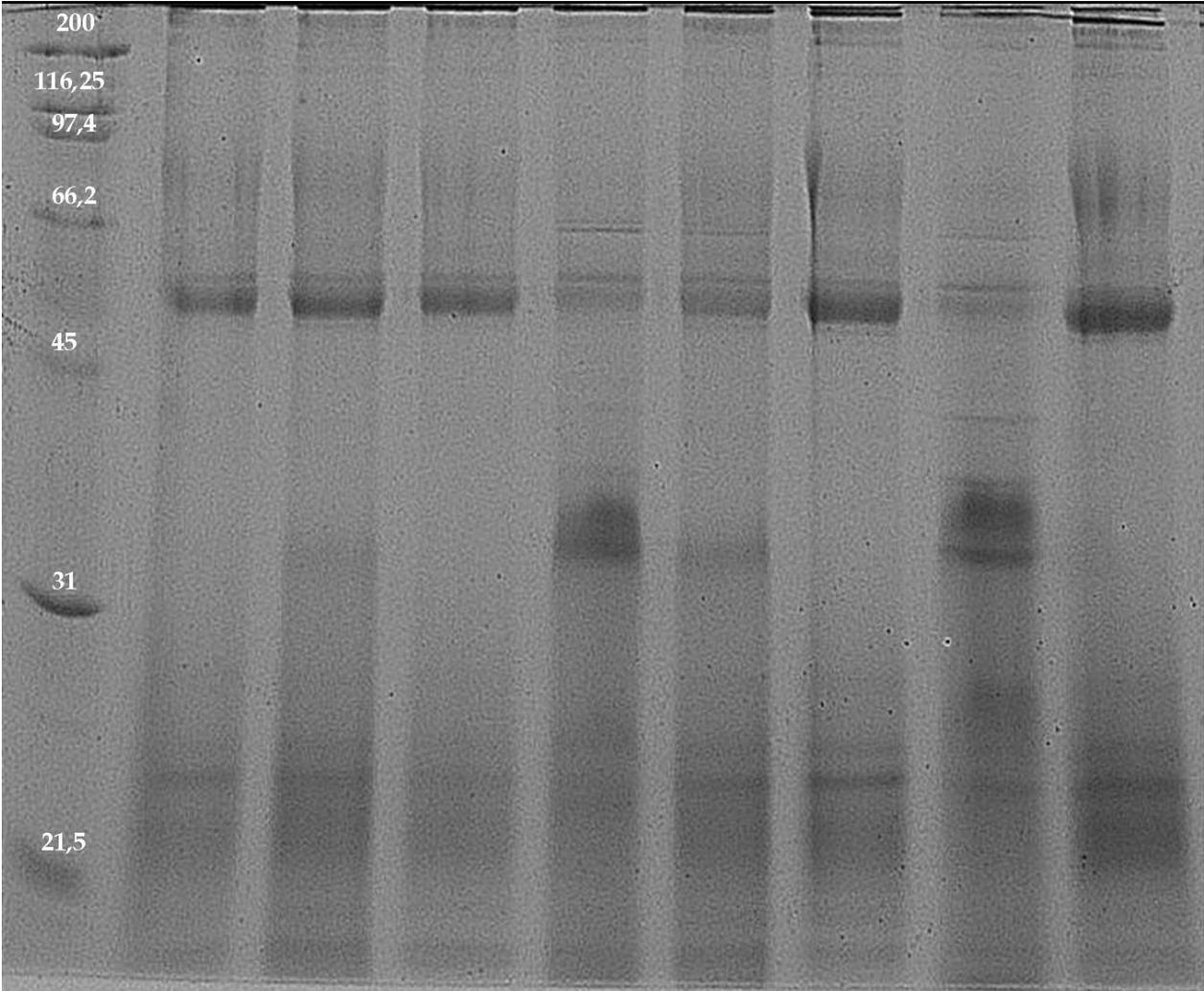


Figura n° 13. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 14% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 4 (Enrico)

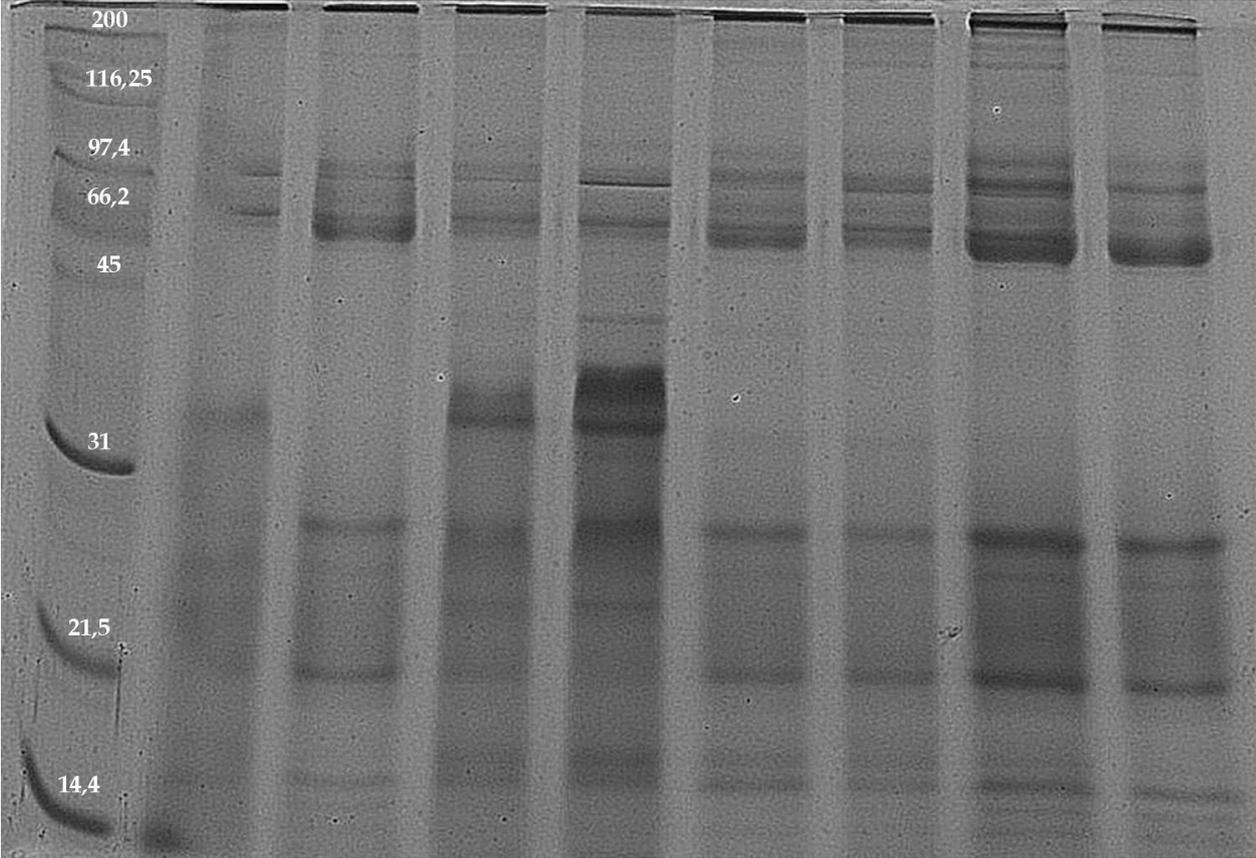
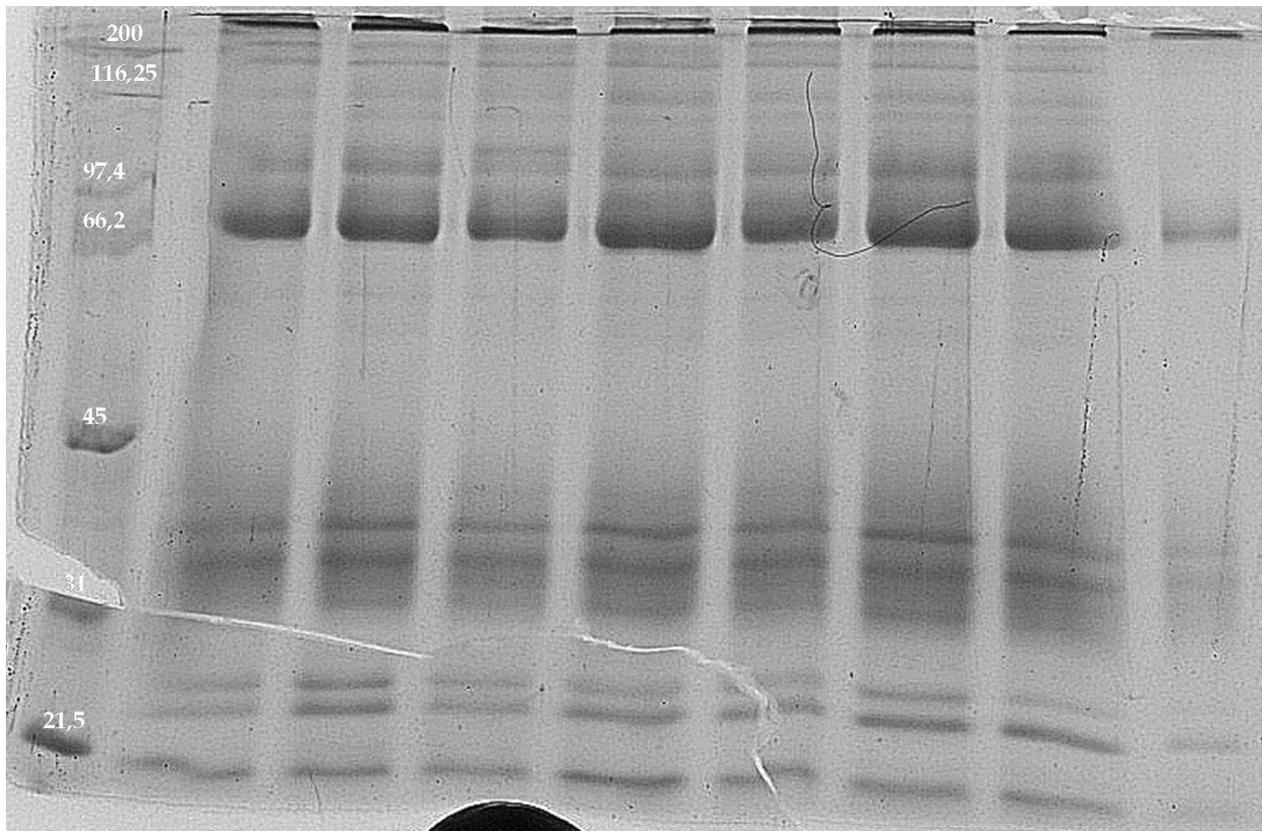


Figura n° 14. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 14% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 5 (El Mariachi)



Dalle immagini si può notare come ci siano delle differenze rilevanti tra i soggetti presi in considerazione. Le bande della fascia 1 sono alquanto simili. Le bande appartenenti alla fascia di peso molecolare 2 sono presenti solamente nel quinto animale, mentre bande appartenenti alla fascia di peso molecolare 3 sono presenti in tutti i soggetti tranne il terzo, ma sono più marcate nel quarto e soprattutto nel quinto animale. Le bande più marcate del terzo soggetto appartengono alla fascia 3, ma le stesse risultano assenti nei soggetti 4 e 5. Per quanto riguarda invece le bande appartenenti alla fascia 5, troviamo un'alta variabilità. Nel primo soggetto sono presenti ma solamente durante la seconda settimana del primo, del secondo e del quarto periodo (ovvero la prima settimana dei periodi con dieta con solo fieno, foraggio fresco e foraggio fresco con l'aggiunta di mangime per cavalli). Nel secondo soggetto si ritrovano in tutte le settimane e sono ben evidenti. Nel terzo soggetto sono presenti solamente durante la seconda settimana del secondo periodo (dieta con foraggio fresco) e la prima settimana del quarto periodo (introduzione nella

dieta di mangime per cavalli). Il quarto soggetto le possiede solo in corrispondenza della prima e della seconda settimana del secondo periodo (dieta con foraggio fresco), mentre il quinto soggetto le presenta in tutte le settimane ma non sono particolarmente evidenti. Le bande appartenenti alla fascia 6 sono riscontrabili in tutti gli animali e in tutte le settimane dei diversi periodi e le bande appartenenti alla fascia 7 mancano al quinto soggetto. Per quest'ultima serie di bande (fascia 7), il primo soggetto non è valutabile in quanto il gel non è riuscito a trattenere le proteine e manca anche la banda standard corrispondente al limite inferiore della fascia.

Per fare un confronto ed avere una conferma dello studio effettuato sui gel con acrilammide al 14%, si presentano di seguito le foto dei gel, sempre corrispondenti ad un singolo soggetto, con acrilammide al 16% (Vedi figure n°15, n°16, n°17, n°18 e n°19).

Figura n° 15. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 16% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 1 (Nerone).

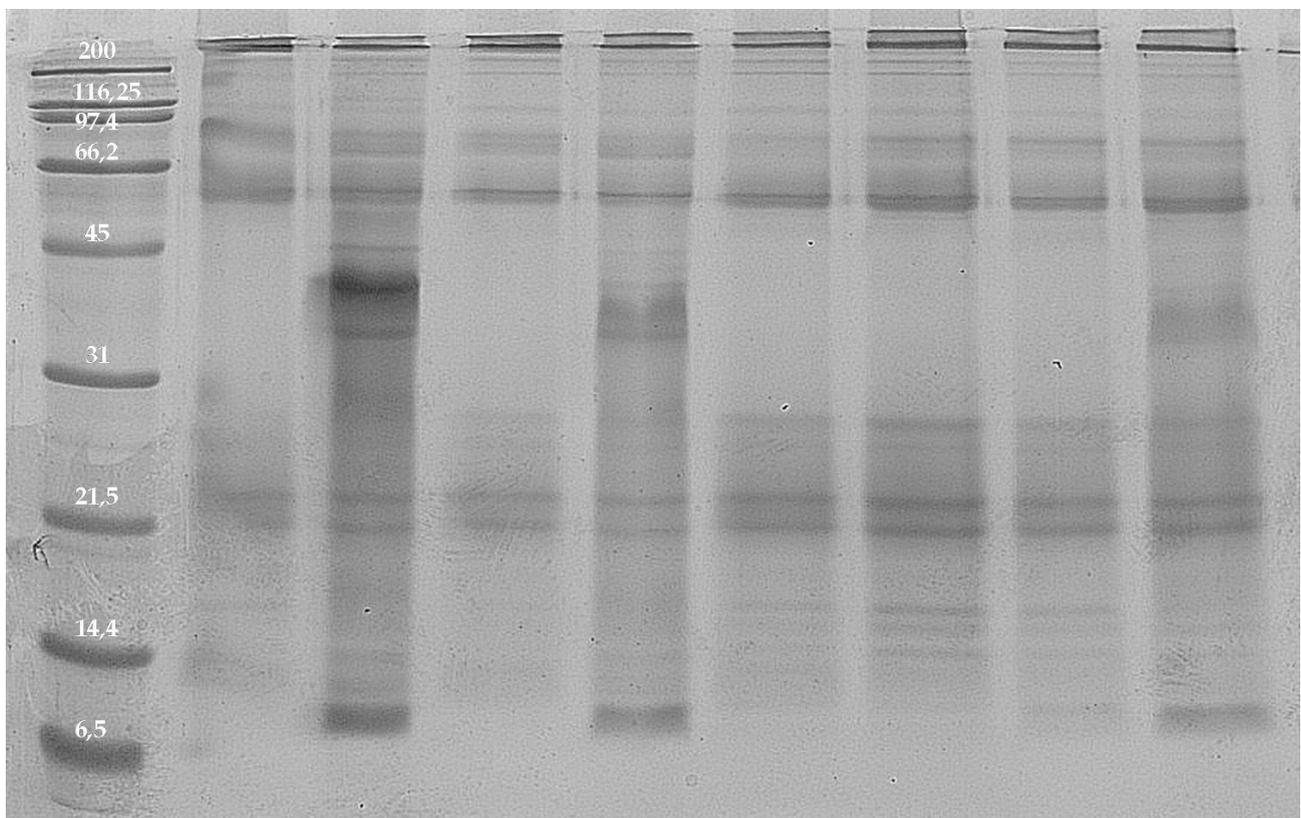


Figura n° 16. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 16% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 2 (Rubens).

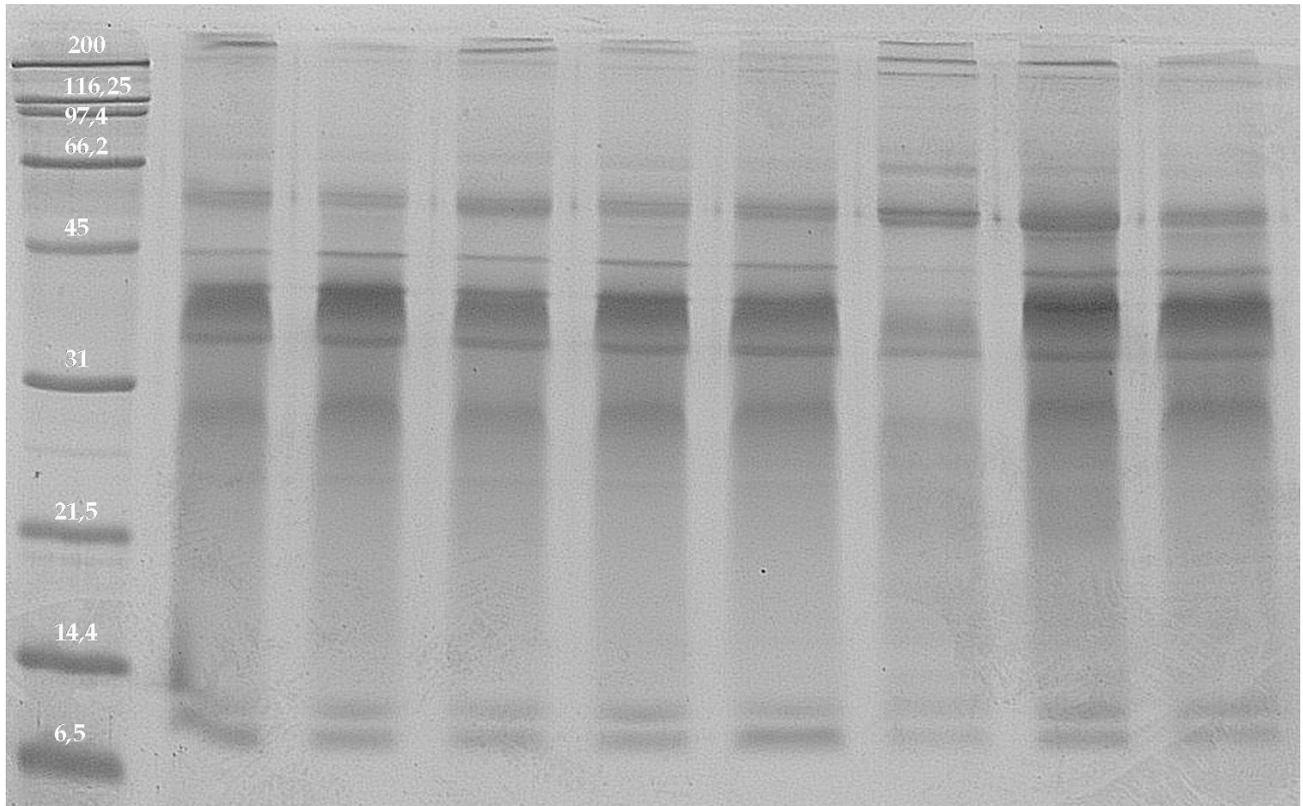


Figura n° 17. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 16% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 3 (Schumi).

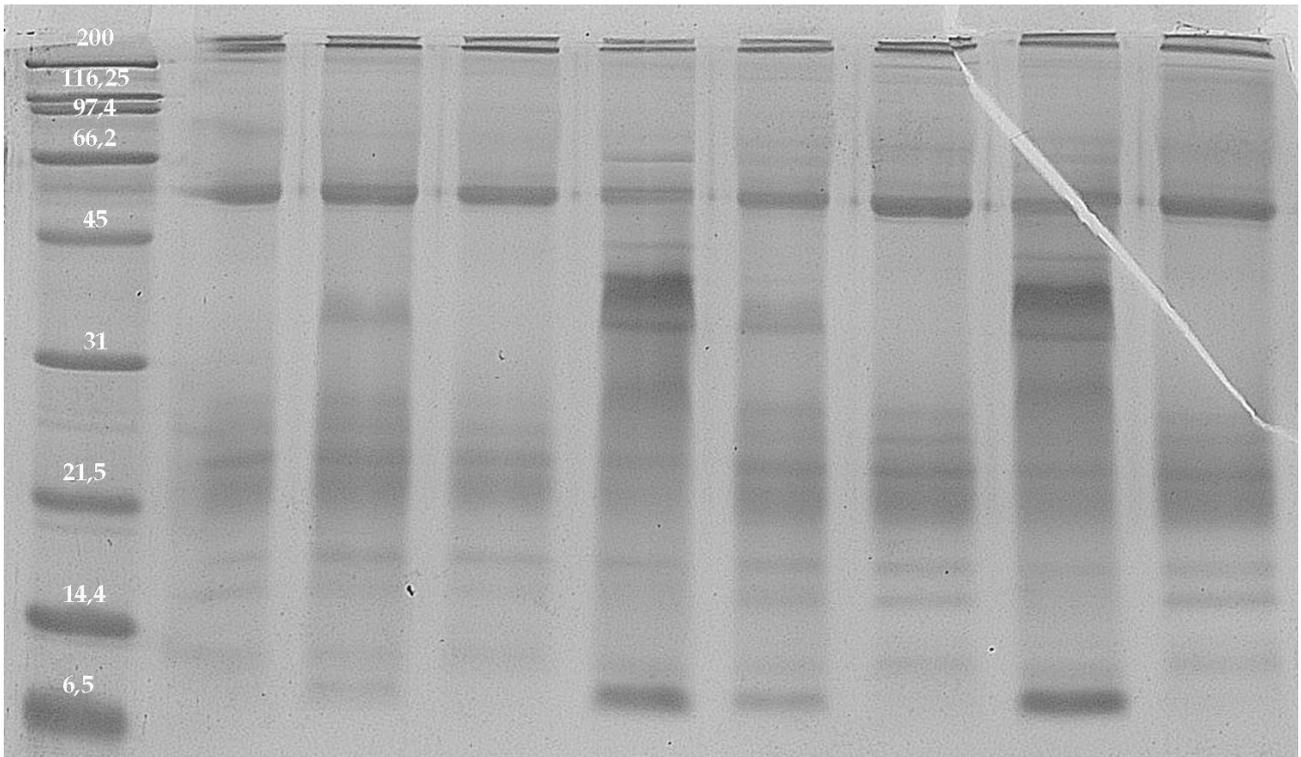


Figura n° 18. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 16% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 4 (Enrico).

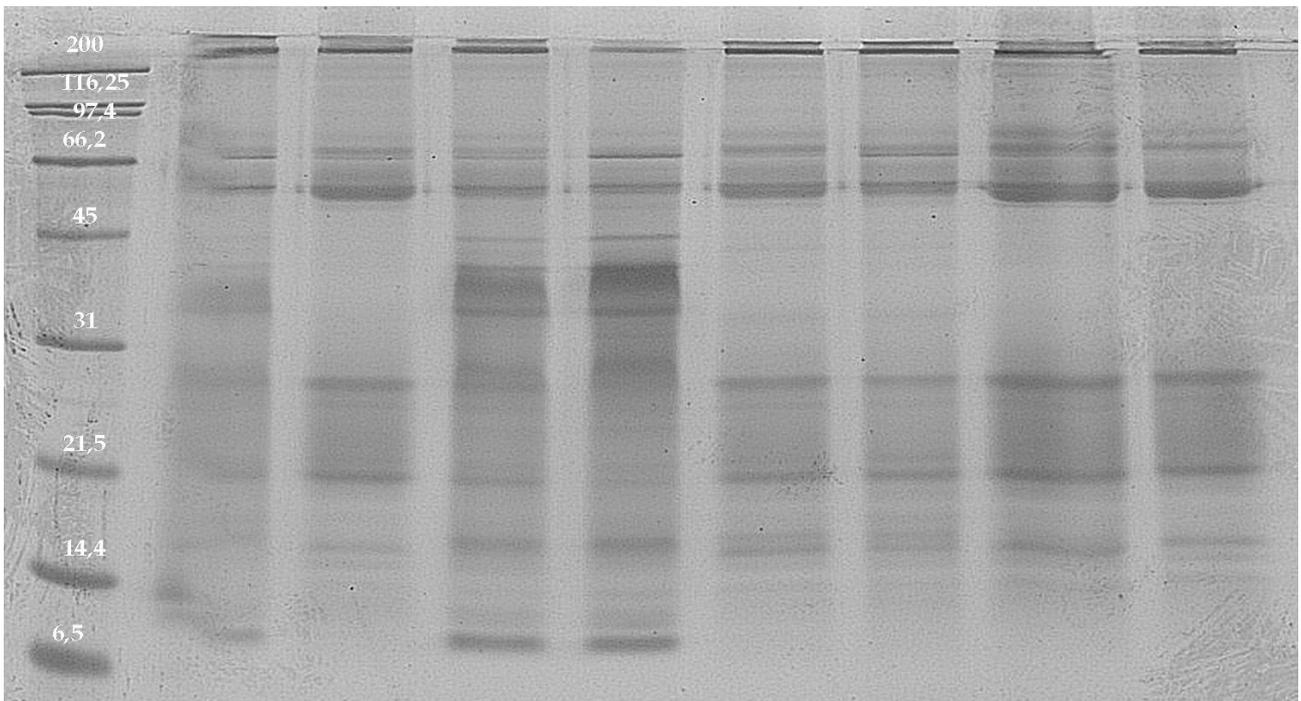
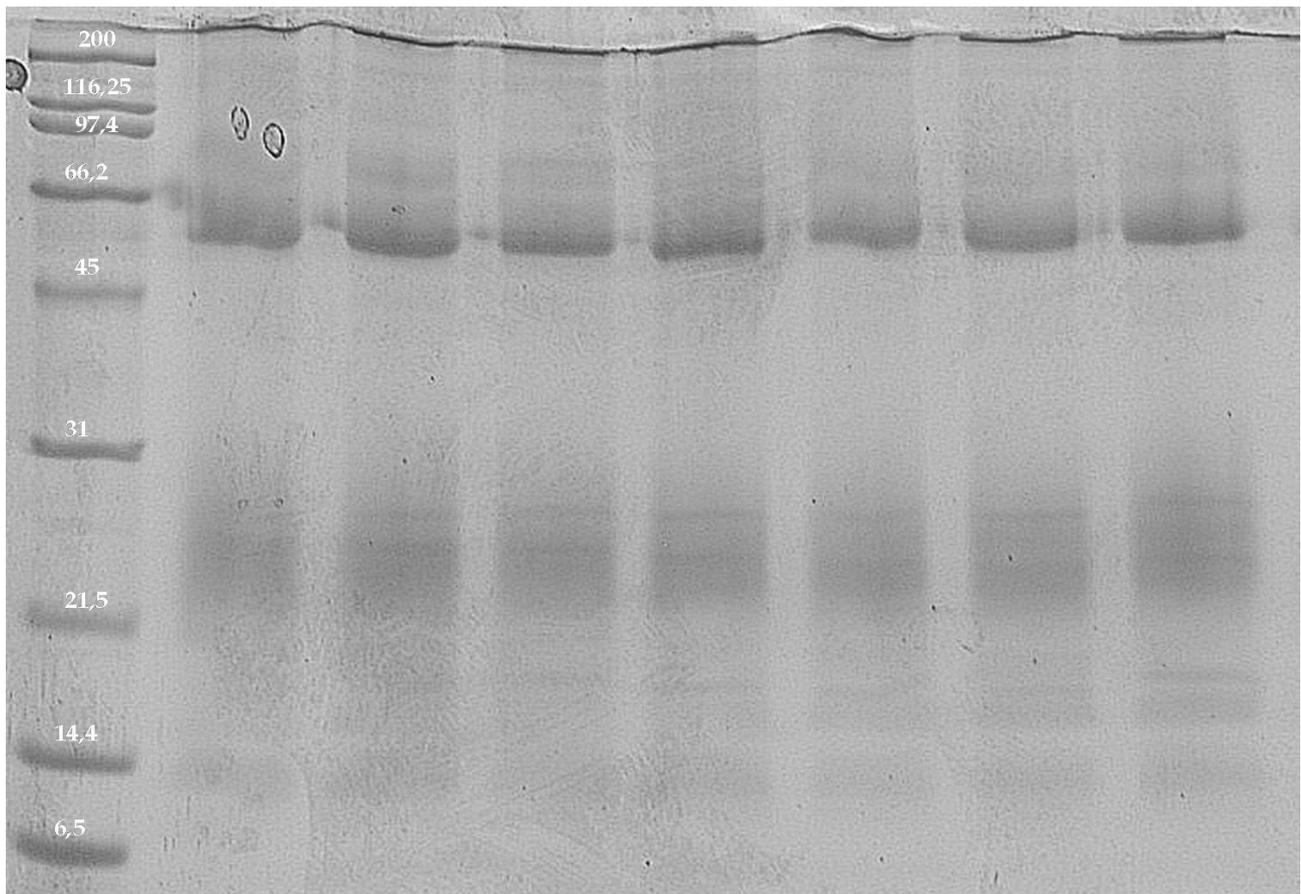


Figura n° 19. Corse elettroforetiche su gel di acrilammide al 16% dei campioni prelevati nelle prime due settimane di ciascuno dei quattro periodi, per l'animale 5 (El Mariachi).



Essendo i gel preparati con il 16% di acrilammide, la rete attraverso cui devono passare le proteine presenta maglie più strette ed in questo modo è stato possibile trattenere all'interno del gel stesso anche le proteine a bassissimo peso molecolare (fino a 6.5 kDa). Dall'osservazione delle immagini ottenute possiamo confermare le identiche distribuzioni già delineatesi nei gel con acrilammide al 14%, specifiche per ogni animale. Bande appartenenti a quella che andrebbe a costituire la fascia di peso molecolare 8 (dai 14,4 ai 6.5 kDa) si ritrovano in tutti i soggetti tranne il quinto. Interessante notare come seguano lo stesso andamento delle bande appartenenti alla fascia di peso molecolare 5, ovvero il primo soggetto le presenta in corrispondenza della seconda settimana del primo, del secondo e del quarto periodo (alimentazione con solo fieno, foraggio fresco e foraggio fresco con l'aggiunta di mangime per cavalli), il secondo le presenta in tutte le settimane dei diversi periodi, nel terzo sono sempre presenti ma maggiormente evidenti durante la seconda settimana del secondo periodo (dieta con foraggio fresco) e la prima settimana del quarto periodo (introduzione del mangime per cavalli), e infine il quarto le presenta solo in concomitanza del secondo periodo (alimentazione con foraggio fresco).

Nonostante questa seconda tipologia di gel abbia dimostrato l'effettiva presenza di proteine di peso inferiore a 14,4 kDa, il nostro studio si è concentrato su proteine a medio-basso peso molecolare, che, secondo la letteratura presa in esame, sono le più importanti per quanto riguarda la qualità del seme, mentre l'OIF, su cui è importante fare luce, presenta un peso molecolare medio-alto (di poco superiore ai 50 kDa). Perciò è stato reputato opportuno utilizzare un gel al 14% che permettesse una migliore distribuzione e visione delle bande di nostro interesse.

3.5 Valori del peso molecolare, delle percentuali e del valore assoluto delle proteine, per periodo e settimana

I dati dell'analisi derivanti dai valori di peso molecolare, percentuale e valore assoluto delle proteine (ottenuti a loro volta da uno studio semiquantitativo sui gel delle elettroforesi), divisi secondo le sette fasce a diverso peso molecolare, sono riassunti nella Tabella n°16.

Tabella n° 16. Valori dei pesi molecolari (PM), delle percentuali (%PT) e del numero assoluto (PT) di proteine (medie \pm ESM) distribuite nelle sette fasce a diverso peso molecolare, nei diversi periodi e nelle prime due settimane di ogni periodo.

	I Periodo		II Periodo		III Periodo		IV Periodo	
	1 ^a Sett	2 ^a Sett						
PM1	200,02 \pm 14,28	206,65 \pm 14,28	200,71 \pm 14,28	204,76 \pm 14,28	199,13 \pm 12,37	199,62 \pm 11,06	194,09 \pm 12,37	208,63 \pm 12,37
%PT1	23,78 \pm 3,88	14,83 \pm 3,88	19,49 \pm 3,88	18,76 \pm 3,88	18,62 \pm 3,36	22,09 \pm 3,01	13,40 \pm 3,36	11,86 \pm 3,36
PT1	0,60 \pm 0,45	0,96 \pm 0,45	0,49 \pm 0,45	0,95 \pm 0,45	0,80 \pm 0,45	1,06 \pm 0,45	0,45 \pm 0,45	0,58 \pm 0,45
PM2	100,84 \pm 4,82	99,97 \pm 3,93	104,02 \pm 4,82	102,48 \pm 4,82	99,21 \pm 4,82	97,29 \pm 4,82	95,60 \pm 4,82	100,20 \pm 6,81
%PT2	13,38 \pm 3,58	15,19 \pm 2,93	17,54 \pm 3,58	17,41 \pm 3,58	18,65 \pm 3,58	19,11 \pm 3,58	15,89 \pm 3,58	10,80 \pm 5,07
PT2	0,04 \pm 0,16	0,32 \pm 0,16	0,23 \pm 0,16	0,34 \pm 0,16	0,22 \pm 0,17	0,23 \pm 0,16	0,17 \pm 0,16	0,00 \pm 0,16
PM3	73,63 \pm 2,28	71,26 \pm 2,28	73,19 \pm 2,28	70,28 \pm 2,28	72,23 \pm 2,28	71,68 \pm 2,28	72,57 \pm 2,28	75,13 \pm 2,63
%PT3	21,18 \pm 3,81	13,34 \pm 4,40	15,66 \pm 3,81	11,62 \pm 3,81	12,97 \pm 3,81	14,56 \pm 3,81	15,21 \pm 3,81	19,25 \pm 4,40
PT3	0,60 \pm 0,61	0,29 \pm 0,61	0,59 \pm 0,61	1,08 \pm 0,61	0,70 \pm 0,61	0,56 \pm 0,61	0,40 \pm 0,61	2,08 \pm 0,61
PM4	54,05 \pm 1,84	56,54 \pm 1,84	55,10 \pm 1,84	57,36 \pm 1,84	57,47 \pm 1,84	54,65 \pm 1,84	58,07 \pm 1,60	57,18 \pm 1,60
%PT4	24,49 \pm 4,99	22,21 \pm 4,99	23,49 \pm 4,99	26,04 \pm 4,99	25,54 \pm 4,99	22,79 \pm 4,99	19,23 \pm 4,32	17,28 \pm 4,32
PT4	0,78 \pm 0,79	2,00 \pm 0,79	0,65 \pm 0,79	2,41 \pm 0,79	1,08 \pm 0,79	0,67 \pm 0,79	0,50 \pm 0,79	0,75 \pm 0,79
PM5	35,23 \pm 1,10	37,50 \pm 1,10	36,39 \pm 1,10	36,08 \pm 0,85	35,91 \pm 1,10	35,40 \pm 1,34	37,47 \pm 1,10	36,26 \pm 1,10
%PT5	18,81 \pm 4,31	28,32 \pm 4,31	23,13 \pm 4,31	24,00 \pm 3,34	23,36 \pm 4,31	18,57 \pm 5,28	24,01 \pm 4,31	27,95 \pm 4,31
PT5	0,52 \pm 1,47	2,50 \pm 1,47	1,02 \pm 1,47	3,55 \pm 1,47	1,52 \pm 1,47	0,42 \pm 1,47	0,98 \pm 1,47	4,11 \pm 1,47
PM6	24,71 \pm 1,32	23,91 \pm 1,03	23,94 \pm 1,15	23,41 \pm 1,15	24,76 \pm 1,03	26,09 \pm 1,15	24,80 \pm 1,03	24,20 \pm 1,03
%PT6	25,83 \pm 8,19	21,97 \pm 6,35	27,11 \pm 7,09	17,59 \pm 7,09	18,43 \pm 6,35	26,19 \pm 7,09	21,80 \pm 6,35	23,50 \pm 6,35
PT6	0,44 \pm 0,64	1,73 \pm 0,64	1,05 \pm 0,64	2,16 \pm 0,64	1,25 \pm 0,64	0,69 \pm 0,64	0,76 \pm 0,64	2,00 \pm 0,64
PM7	18,28 \pm 1,59	16,16 \pm 1,43	16,56 \pm 1,43	16,36 \pm 1,43	16,31 \pm 1,43	16,92 \pm 1,43	15,81 \pm 1,43	15,69 \pm 1,43
%PT7	27,45 \pm 5,46	21,70 \pm 4,88	19,10 \pm 4,88	18,79 \pm 4,88	19,50 \pm 4,88	16,57 \pm 4,88	19,18 \pm 4,88	22,71 \pm 4,88
PT7	1,62 \pm 1,13	2,41 \pm 1,13	1,17 \pm 1,13	3,10 \pm 1,13	1,62 \pm 1,13	0,77 \pm 1,13	0,94 \pm 1,13	2,27 \pm 1,13

In nessuna delle sette fasce a diverso peso molecolare sono risultate delle differenze significative. Guardando però le immagini si può capire come le differenze risiedano tra soggetto e soggetto. Avendo in questo caso considerato, per l'analisi statistica, gli animali come un gruppo omogeneo, le differenze si sono appianate e non risultano significative.

Un'ulteriore analisi statistica è stata effettuata rapportando questa volta i quattro periodi a diversa alimentazione con i cinque diversi animali, in modo da poter mettere in evidenza le differenze soggettive.

4.6 Biochimico del plasma ematico, per periodo ed animale

I valori dei risultati ottenuti dal biochimico del plasma ematico, sono stati ancora una volta suddivisi in valori dei macroelementi (P, Mg e Ca) (vedi Tabella n°17), valori enzimatici (GGT, ALP, ALT e CK) (vedi Tabella n°18), valori del profilo energetico (GLU, TG e COL), con confronto anche del BCS degli animali (vedi Tabella n°19), e valori delle componenti proteiche (Urea, CRE, PT e ALB) (vedi Tabella n°20).

Tabella n° 17. Valori dei macroelementi (media \pm ESM) presenti nel plasma ematico, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens -2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
P (mg/dl)	1	1,83 \pm 0,80 a	3,70 \pm 0,80	2,08 \pm 0,80 a	1,35 \pm 0,80 a	4,18 \pm 0,80
	2	1,45 \pm 0,80 a	4,18 \pm 0,80	1,78 \pm 0,80 a	2,63 \pm 0,80 ab	4,15 \pm 0,80
	3	5,00 \pm 0,80 b	4,40 \pm 0,80	5,63 \pm 0,80 b	3,75 \pm 0,80 ab	6,63 \pm 0,80
	4	6,03 \pm 0,80 b	5,98 \pm 0,80	4,60 \pm 0,80 ab	5,05 \pm 0,80 b	5,40 \pm 0,80
Mg (mg/dl)	1	3,09 \pm 0,25*°	2,64 \pm 0,25*°	2,31 \pm 0,25*	2,56 \pm 0,25*	3,64 \pm 0,29Φ° a
	2	3,12 \pm 0,25	2,79 \pm 0,25	2,46 \pm 0,25	2,64 \pm 0,25	2,65 \pm 0,25 ab
	3	2,97 \pm 0,29	2,72 \pm 0,25	2,68 \pm 0,25	2,34 \pm 0,25	3,09 \pm 0,25 ab
	4	2,32 \pm 0,25	2,44 \pm 0,25	2,19 \pm 0,25	1,94 \pm 0,25	2,41 \pm 0,25 b
Ca (mg/dl)	1	9,41 \pm 0,42	9,24 \pm 0,42	9,24 \pm 0,42	8,78 \pm 0,42	9,20 \pm 0,42
	2	9,21 \pm 0,42	9,30 \pm 0,42	9,02 \pm 0,42	9,98 \pm 0,42	8,97 \pm 0,42
	3	9,18 \pm 0,42	9,60 \pm 0,42	9,68 \pm 0,42	9,02 \pm 0,42	9,30 \pm 0,42
	4	8,75 \pm 0,42	9,06 \pm 0,42	9,52 \pm 0,42	8,38 \pm 0,42	8,80 \pm 0,42

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 18. Valori enzimatici (media \pm ESM) del plasma ematico, nei diversi periodi e per i diversi animali.

		Animale				
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
GGT (UI/l)	1	11,00 \pm 1,07*	6,75 \pm 1,07* a	10,25 \pm 1,07*	18,75 \pm 1,07 Φ	16,00 \pm 1,07 Φ
	2	12,50 \pm 1,07* ^o	10,50 \pm 1,07* ab	10,50 \pm 1,07*	19,75 \pm 1,07 Φ	15,75 \pm 1,07 Φ ^o
	3	14,25 \pm 1,07* ^o	11,00 \pm 1,07* b	11,25 \pm 1,07*	20,00 \pm 1,07 Φ	18,00 \pm 1,07 Φ ^o
	4	13,50 \pm 1,07*	8,50 \pm 1,07 ^o ab	12,00 \pm 1,07* ^o	19,75 \pm 1,07 [^]	16,50 \pm 1,07* ^{^o}
ALP (UI/l)	1	77,50 \pm 9,75a	57,75 \pm 9,75	69,50 \pm 9,75 a	77,25 \pm 9,75 a	40,75 \pm 9,75
	2	115,00 \pm 9,75* b	65,75 \pm 9,75 ^o	132,00 \pm 9,75b*	124,75 \pm 9,75b*	54,00 \pm 9,75 ^o
	3	81,75 \pm 9,75* [^] ab	68,00 \pm 9,75*	115,25 \pm 9,75 ^o b	99,50 \pm 9,75* ^o ab	43,25 \pm 9,75 [^]
	4	76,75 \pm 9,75* a	54,00 \pm 9,75 ^{^*}	151,25 \pm 9,75 ^o b	119,00 \pm 9,75 ^o b	33,00 \pm 9,75 [^]
ALT (UI/l)	1	9,25 \pm 1,25* a	10,75 \pm 1,25*a	14,00 \pm 1,25* ^o a	14,00 \pm 1,25* ^o a	17,25 \pm 1,25 ^o a
	2	12,75 \pm 1,25* ab	14,25 \pm 1,25* ^o ab	18,75 \pm 1,25 ^o b	19,50 \pm 1,25 ^o [^] b	18,75 \pm 1,25 ^o b
	3	15,25 \pm 1,25* b	19,75 \pm 1,25* [^] b	26,00 \pm 1,25 ^o c	24,50 \pm 1,25 ^o [^] c	29,00 \pm 1,25 ^o c
	4	12,00 \pm 1,25* ab	15,75 \pm 1,25* [^] b	24,00 \pm 1,25 ^o c	18,50 \pm 1,25 ^o [^] ab	23,00 \pm 1,25 ^o ab
CK (UI/l)	1	33,00 \pm 105,39	48,25 \pm 105,39	104,25 \pm 105,39	89,00 \pm 105,39	103,25 \pm 105,39
	2	20,25 \pm 105,39	81,00 \pm 105,39	23,50 \pm 105,39	331,50 \pm 105,39	25,50 \pm 105,39
	3	151,00 \pm 105,39	32,00 \pm 105,39	46,75 \pm 105,39	27,75 \pm 105,39	594,50 \pm 105,39
	4	20,259 \pm 105,39	20,75 \pm 105,39	17,50 \pm 105,39	11,25 \pm 105,39	35,53 \pm 105,39

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 19. Valori del profilo energetico (media \pm ESM) del plasma ematico, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
GLU (mg/dl)	1	97,75 \pm 12,93	101,75 \pm 12,93 a	96,75 \pm 12,93	103,75 \pm 12,93	121,25 \pm 12,93
	2	106,75 \pm 12,93	152,00 \pm 12,93 b	118,25 \pm 12,93	133,25 \pm 12,93	131,75 \pm 12,93
	3	110,50 \pm 12,93	114,50 \pm 12,93 b	117,00 \pm 12,93	118,00 \pm 12,93	153,75 \pm 12,93
	4	93,50 \pm 12,93	108,50 \pm 12,93 b	128,25 \pm 12,93	132,00 \pm 12,93	124,75 \pm 12,93
TG (mg/dl)	1	15,25 \pm 2,97	22,00 \pm 2,97	20,75 \pm 2,97	22,75 \pm 2,97	17,75 \pm 2,97
	2	11,25 \pm 2,97*	21,75 \pm 2,97*°	18,00 \pm 2,97*°	25,75 \pm 2,97°	20,00 \pm 2,97*°
	3	13,75 \pm 2,97	22,50 \pm 2,97	23,00 \pm 2,97	23,75 \pm 2,97	24,25 \pm 2,97
	4	10,50 \pm 2,97*	27,25 \pm 2,97°	24,50 \pm 2,97°	20,75 \pm 2,97*°	20,75 \pm 2,97*°
COL (mg/dl)	1	23,25 \pm 15,10	33,50 \pm 15,10	37,75 \pm 15,10	33,25 \pm 15,10	34,50 \pm 15,10
	2	20,50 \pm 15,10	28,00 \pm 15,10	30,50 \pm 15,10	31,00 \pm 15,10	26,75 \pm 15,10
	3	17,75 \pm 15,10	33,50 \pm 15,10	34,50 \pm 15,1	26,00 \pm 15,10	28,25 \pm 15,10
	4	14,50 \pm 15,10	90,00 \pm 15,10	33,50 \pm 15,10	26,75 \pm 15,10	22,00 \pm 15,10
BCS	1	2,88 \pm 0,11*°	2,69 \pm 0,11*	3,19 \pm 0,11°	2,75 \pm 0,11*	2,81 \pm 0,11*°
	2	2,94 \pm 0,11*	2,75 \pm 0,11*	3,13 \pm 0,11*	2,81 \pm 0,11*°	2,94 \pm 0,11*°
	3	3,19 \pm 0,11	2,69 \pm 0,11	3,25 \pm 0,11	2,94 \pm 0,11	3,06 \pm 0,11
	4	3,25 \pm 0,11*°	2,88 \pm 0,11*	3,38 \pm 0,11°	2,94 \pm 0,11*	3,00 \pm 0,11*°

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Tabella n° 20. Valori del profilo proteico (media \pm ESM) del plasma ematico, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
UREA (mg/dl)	1	29,9 \pm 3,08 a	31,48 \pm 3,08 a	27,03 \pm 3,08 a	25,55 \pm 3,08 a	27,25 \pm 3,08 a
	2	50,83 \pm 3,08* b	38,25 \pm 3,08° a	38,35 \pm 3,08° a	45,45 \pm 3,08^°b	41,48 \pm 3,08^°b
	3	43,35 \pm 3,08b	49,48 \pm 3,08 b	45,68 \pm 3,08 b	44,85 \pm 3,08b	55,33 \pm 3,08 c
	4	27,95 \pm 3,08* a	32,75 \pm 3,08*^ a	43,58 \pm 3,08^b	27,93 \pm 3,08* a	42,25 \pm 3,08^ b
CRE (mg/dl)	1	2,14 \pm 0,16* a	2,29 \pm 0,16* a	2,67 \pm 0,16*^	2,97 \pm 0,16^° a	2,30 \pm 0,16*
	2	1,57 \pm 0,16* ab	1,91 \pm 0,16* ab	2,15 \pm 0,16*^	2,76 \pm 0,16^° a	2,08 \pm 0,16*
	3	1,40 \pm 0,16* b	1,65 \pm 0,16*° bc	2,17 \pm 0,16°	1,92 \pm 0,16*° b	2,07 \pm 0,16°
	4	1,41 \pm 0,16* b	1,74 \pm 0,16*° ac	2,12 \pm 0,16°	2,08 \pm 0,16°b	2,12 \pm 0,16°
PT (g/l)	1	72,00 \pm 3,18	66,25 \pm 3,18	68,75 \pm 3,18	62,00 \pm 3,18	66,00 \pm 3,18
	2	72,50 \pm 3,18	72,50 \pm 3,18	68,50 \pm 3,18	67,25 \pm 3,18	68,25 \pm 3,18
	3	73,75 \pm 3,18	74,75 \pm 3,18	74,00 \pm 3,18	65,25 \pm 3,18	74,25 \pm 3,18
	4	69,50 \pm 3,18*°	69,25 \pm 3,18*°	73,25 \pm 3,18*	59,00 \pm 3,18*°	68,50 \pm 3,18*°
ALB (g/l)	1	35,40 \pm 1,56	35,05 \pm 1,56	38,38 \pm 1,56	33,85 \pm 1,56	34,45 \pm 1,56
	2	36,30 \pm 1,56	33,53 \pm 1,56	38,48 \pm 1,56	36,63 \pm 1,56	34,65 \pm 1,56
	3	36,53 \pm 1,56*°	36,48 \pm 1,56*°	42,05 \pm 1,56*	35,48 \pm 1,56°	40,08 \pm 1,56*°
	4	35,20 \pm 1,56*^	35,70 \pm 1,56*°	41,43 \pm 1,56°	32,50 \pm 1,56^	36,93 \pm 1,56*°^

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

Dai dati ottenuti dall'analisi dei macroelementi si può vedere come, nel caso del fosforo, non ci siano differenze significative tra i cinque animali. All'interno dei diversi soggetti però si nota che il primo ed il terzo animale presentano un aumento significativo dei valori durante il terzo ed il quarto periodo (introduzione dei mangimi), il quarto animale presenta invece un aumento progressivo e significativo dal primo al quarto periodo, mentre il quinto animale non presenta alcuna variazione significativa ma possiede in generale dei valori più elevati degli altri soggetti. I valori di magnesio rimangono costanti nell'ambito dello stesso soggetto, tranne nel quinto animale dove c'è una significativa diminuzione dal primo al quarto periodo. Tra i soggetti sono presenti delle differenze significative durante il primo periodo, in cui si vede come il primo ed il quinto animale presentino valori più elevati degli altri. Nei periodi successivi i valori tendono ad uniformarsi. Il calcio, al contrario dei cationi precedenti, non presenta alcuna variazione significativa, né all'interno dei soggetti né tra i diversi soggetti.

A livello di profilo enzimatico, la γ -glutammina transferasi presenta differenze significative tra i soggetti in tutti e quattro i periodi, legate a valori più elevati nel primo

e nel quinto animale. All'interno dello stesso soggetto, solo il secondo presenta una diminuzione significativa del valore durante il secondo periodo (dieta con foraggio fresco). La fosfatasi alcalina differisce significativamente per il secondo ed il quinto animale, i cui valori sono minori degli altri, durante il secondo, il terzo ed il quarto periodo. Il primo soggetto poi presenta un aumento significativo in corrispondenza del secondo periodo (dieta con foraggio fresco), mentre il terzo ed il quarto animale presentano valori significativamente più bassi nel primo periodo (dieta con solo fieno). L'alanina aminotransferasi risulta invece significativamente più elevata nel terzo, nel quarto e nel quinto animale durante il secondo, il terzo ed il quarto periodo. In ciascun animale tende comunque ad aumentare in modo significativo nel secondo e nel terzo periodo (dieta con foraggio fresco ed introduzione poi di mangime per ovini). Nel quarto periodo (con l'introduzione del mangime per cavalli) tende a diminuire ma rimane a valori più elevati rispetto al primo periodo (dieta con solo fieno). La creatin kinasi non presenta nessuna variazione significativa, né tra gli animali né all'interno dello stesso animale.

Per quanto riguarda i parametri energetici, il glucosio non presenta differenze significative tra i diversi animali, però nel secondo soggetto si può notare un valore significativamente più basso nel primo periodo (dieta con solo fieno). Il primo animale risulta avere un valore di trigliceridi significativamente più basso degli altri durante il secondo ed il terzo periodo (dieta con foraggio fresco ed introduzione del mangime per ovini). All'interno dello stesso soggetto i valori si mantengono costanti. Il colesterolo non presenta alcuna variazione, né tra i soggetti né all'interno dello stesso soggetto. I valori di BCS rimangono invece costanti all'interno degli stessi animali ma vi sono valori significativamente più elevati per il terzo soggetto, durante il primo, il secondo ed il quarto periodo.

Sotto il profilo proteico, l'urea presenta una variazione significativa tra i soggetti nel secondo periodo, in cui l'animale 1 possiede i valori più elevati, e nel quarto periodo, in cui lo stesso animale presenta i valori più bassi. All'interno dei soggetti c'è alta variabilità in quanto il primo ed quarto animale presentano valori significativamente più elevati durante il secondo ed il terzo periodo (foraggio fresco ed introduzione del mangime per ovini), il secondo animale presenta valori significativamente più alti

solo nel terzo periodo (mangime per ovini), il terzo soggetto mostra valori significativamente più alti nel terzo e nel quarto periodo (introduzione dei mangimi), mentre il quinto animale possiede valori significativamente più bassi durante il primo periodo (solo fieno) e più alti nel terzo periodo (mangime per ovini). La creatinina presenta, durante il primo ed il secondo periodo, dei valori significativamente più elevati legati al quarto soggetto, mentre nel terzo e nel quarto periodo questa differenza significativa è apportata dal soggetto 3. All'interno degli stessi soggetti, tutti i valori tendono a diminuire significativamente dal primo al quarto periodo. Le proteine totali non subiscono nessuna variazione, né tra i soggetti né all'interno dello stesso soggetto. L'albumina non ha variazioni all'interno del soggetto ma si può trovare una differenza significativa nel terzo e nel quarto periodo, in cui il terzo animale presenta valori più alti.

4.7 Biochimico del plasma seminale, per periodo ed animale

I valori dei risultati ottenuti dal biochimico del plasma seminale, sono stati anch'essi

suddivisi in valori dei macroelementi (P) (vedi Tabella n°21), valori enzimatici (GGT, ALP, ALT) (vedi Tabella n°22), valori del profilo energetico (GLU, TG e COL) (vedi Tabella n°23) e valori delle componenti proteiche (Urea e PT) (vedi Tabella n°24). I dati relativi a Ca e Mg, CK, CRE e ALB risultano mancanti in quanto i valori biochimici sono assenti per alcuni animali, e quindi non è stato possibile effettuare le analisi statistiche. Ciò è legato al congelamento del seme dei campioni migliori durante la terza e la quarta settimana di ogni periodo, che non ha permesso la conservazione del liquido seminale. Inoltre alcuni soggetti hanno presentato valori troppo elevati o troppo bassi dei parametri, quali calcio e magnesio, tali da superare la soglia massima e minima di determinazione dell'analizzatore automatico (rispettivamente 16 mg/dl e 4.86 m/dl).

Tabella n° 21. Valori del fosforo (media ± ESM) del plasma seminale, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
P (mg/dl)	1	2,10 ± 0,70*	5,40 ± 0,86°	0,27 ± 0,7*	1,25 ± 0,86* ab	0,13 ± 0,70*
	2	1,13 ± 0,70*°	4,00 ± 0,86*	1,53 ± 0,61*°	3,38 ± 0,61* a	0,05 ± 0,86°^
	3	0,20 ± 0,61*	3,25 ± 0,86°	0,55 ± 0,61*°	1,37 ± 0,70*° ab	0,03 ± 0,70*
	4	0,17 ± 0,70	2,20 ± 0,86	0,48 ± 0,61	0,63 ± 0,70 b	1,08 ± 0,61

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa (P<0,05). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa (P<0,05).

Tabella n° 22. Valori enzimatici (media ± ESM) del plasma seminale, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
GGT (UI/l)	1	476,33 ± 136,79	614,50 ± 167,54	93,00 ± 136,79	168,50 ± 167,54	169,00 ± 136,79
	2	308,33 ± 136,79	705,50 ± 167,54	370,33 ± 136,79	573,00 ± 118,47	187,00 ± 167,54
	3	94,25 ± 118,47	594,50 ± 167,54	234,25 ± 118,47	398,00 ± 136,79	167,67 ± 136,79
	4	119,00 ± 136,79	468,50 ± 167,54	271,50 ± 118,47	199,00 ± 136,79	152,50 ± 118,47
ALP (UI/l)	1	1842,33 ± 284,28* a	1487,00 ± 348,18*^	199,33 ± 284,28°	234,50 ± 348,18°^	441,67 ± 284,28°^
	2	1145,67 ± 284,28 ab	1546,00 ± 348,18	392,00 ± 284,28	998,50 ± 246,20	301,50 ± 348,18
	3	286,25 ± 246,20 b	810,50 ± 348,18	456,00 ± 246,20	212,00 ± 284,28	311,33 ± 284,28
	4	401,00 ± 284,28 b	690,50 ± 348,18	463,25 ± 246,20	96,00 ± 284,28	226,50 ± 246,20
ALT (UI/l)	1	13,33 ± 9,34*	75,50 ± 11,44° a	6,00 ± 9,34*	5,50 ± 11,44*	8,33 ± 9,34*
	2	7,33 ± 9,34*	68,50 ± 11,44 °a	14,50 ± 8,09*	23,00 ± 9,34*	15,00 ± 11,44*
	3	2,25 ± 8,09	9,50 ± 11,44 b	15,50 ± 8,09	18,50 ± 11,44	12,00 ± 9,34
	4	3,33 ± 9,34	22,50 ± 11,44 b	13,75 ± 8,09	2,67 ± 9,34	5,75 ± 8,09

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa (P<0,05). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa (P<0,05).

Tabella n° 23. Valori del profilo energetico (media \pm ESM) del plasma seminale, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
GLU (mg/dl)	1	1,67 \pm 3,86	3,50 \pm 4,73	1,33 \pm 3,86	3,00 \pm 4,73	2,00 \pm 3,86
	2	1,67 \pm 3,86	3,50 \pm 4,73	1,75 \pm 3,35	2,00 \pm 3,35	2,50 \pm 4,73
	3	1,25 \pm 3,35	3,50 \pm 4,73	1,75 \pm 3,35	1,33 \pm 3,86	2,50 \pm 4,73
	4	1,00 \pm 3,86	1,50 \pm 4,73	1,25 \pm 3,35	1,00 \pm 3,86	2,50 \pm 4,73
TG (mg/dl)	1	68,67 \pm 22,76*°	156,00 \pm 27,87°	16,67 \pm 22,76*	46,50 \pm 27,88*°	20,00 \pm 22,76*
	2	37,67 \pm 22,76*	149,50 \pm 27,87°	48,50 \pm 19,71*	97,00 \pm 19,71*°	61,00 \pm 27,87*°
	3	5,00 \pm 19,71*	122,00 \pm 27,87°	10,25 \pm 19,71*	45,33 \pm 22,76*°	3,00 \pm 22,76*
	4	6,33 \pm 22,76	76,50 \pm 27,87	13,25 \pm 19,71	22,67 \pm 22,76	57,50 \pm 19,71
COL (mg/dl)	1	1,33 \pm 7,27	6,00 \pm 8,91	0,67 \pm 7,27	4,00 \pm 8,91	1,67 \pm 7,27
	2	1,50 \pm 8,91	4,50 \pm 8,91	2,33 \pm 7,27	3,00 \pm 6,30	1,50 \pm 8,91
	3	-	3,00 \pm 8,91	2,50 \pm 8,91	1,50 \pm 8,91	1,33 \pm 7,27
	4	0,50 \pm 8,91	1,50 \pm 8,91	0,50 \pm 8,91	-	36,25 \pm 6,30

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa (P<0,05). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa (P<0,05).

Tabella n° 24. Valori del profilo proteico (media \pm ESM) del plasma seminale, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
UREA (mg/dl)	1	28,43 \pm 8,31	44,70 \pm 10,18	50,93 \pm 8,31	31,60 \pm 10,18 a	34,00 \pm 8,31
	2	46,83 \pm 8,31	68,25 \pm 10,18	35,70 \pm 7,20	41,08 \pm 7,20 ab	34,55 \pm 10,18
	3	41,50 \pm 7,20	61,30 \pm 10,18	37,08 \pm 7,20	69,37 \pm 8,31 b	52,73 \pm 8,31
	4	24,00 \pm 8,31	31,00 \pm 10,18	35,84 \pm 7,20	32,43 \pm 8,31 a	44,33 \pm 7,20
PT (d/l)	1	5,67 \pm 3,34*	25,00 \pm 4,09°	4,33 \pm 3,34*	3,00 \pm 4,09 *	2,67 \pm 3,34*
	2	3,00 \pm 3,34*	23,50 \pm 4,09°	8,50 \pm 2,89*	7,25 \pm 2,89*	2,00 \pm 4,09*
	3	2,25 \pm 2,89	16,00 \pm 4,09	5,50 \pm 2,89	3,33 \pm 3,34	2,33 \pm 3,34
	4	2,33 \pm 3,34	17,00 \pm 4,09	5,50 \pm 2,89	2,33 \pm 3,34	14,50 \pm 2,89

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).
Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

I dati relativi al fosforo indicano valori più elevati per il secondo soggetto, anche se ciò è significativo solo in corrispondenza del primo, del secondo e del terzo periodo. All'interno degli stessi soggetti i valori rimangono costanti, tranne nel quarto soggetto, che presenta un valore significativamente più basso nel terzo periodo (mangime per ovini).

Tra i parametri enzimatici la γ -glutammil transferasi non presenta differenze significative, né tra i soggetti né all'interno di uno stesso soggetto. La fosfatasi alcalina risulta significativamente più elevata per il primo ed il secondo soggetto durante il primo periodo (dieta con solo fieno). All'interno degli animali non ci sono variazioni significative ma in generale si può evidenziare una diminuzione dei valori dal primo al quarto periodo. L'alanina aminotrasferasi presenta differenze significative solo tra i soggetti, nel primo e nel secondo periodo, in cui il terzo soggetto presenta valori più alti. All'interno degli stessi soggetti non vi sono differenze.

Il profilo energetico, sia riguardo il glucosio sia riguardo il colesterolo, non mostra differenze significative, né tra gli animali né all'interno dello stesso animale. Anche i trigliceridi non presentano variazioni all'interno dello stesso soggetto ma, tra gli animali, il secondo possiede valori

significativamente più elevati nel primo, nel secondo e nel terzo periodo.

A livello di profilo proteico, l'urea non presenta nessuna differenza significativa, ma in generale i valori tendono ad essere più alti nel terzo periodo (introduzione del mangime per ovini). Il secondo soggetto mostra, nei riguardi delle proteine totali, dei valori più elevati rispetto agli altri soggetti ma tale differenza è significativa solamente nel primo e nel secondo periodo. Non vi sono variazioni all'interno degli stessi animali.

4.8 Valutazione della qualità del seme, per periodo ed animale

I valori dei risultati ottenuti dalla valutazione dei parametri di qualità del seme sono mostrati nella Tabella n°25.). I dati relativi a motilità e concentrazione risultano mancanti in quanto i valori sono assenti per l'animale 5 che non ha mai fornito seme; quindi non è stato possibile effettuare le analisi statistiche

Tabella n° 25. Valori dei parametri qualitativi (media \pm ESM) presi in considerazione per la valutazione del seme, nei diversi periodi e per i diversi animali.

	Animale					
	Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
Tempo di raccolta (min)	1	14,25 \pm 1,31 a	17,00 \pm 1,31	19,67 \pm 1,51	19,25 \pm 1,31	15,33 \pm 1,51 a
	2	8,00 \pm 1,31* b	14,75 \pm 1,31°	17,00 \pm 1,31°	16,75 \pm 1,31°	11,67 \pm 1,51*° ab
	3	13,50 \pm 1,31*^ a	18,00 \pm 1,31*°	19,00 \pm 1,31°	17,50 \pm 1,31*°	9,25 \pm 1,31^ b
	4	12,25 \pm 1,31* ab	17,00 \pm 1,31*°	16,00 \pm 1,31*°	17,75 \pm 1,31°	12,50 \pm 1,31* ab
Viscosità	1	2,50 \pm 0,27*	1,00 \pm 0,27°	2,33 \pm 0,31*	2,25 \pm 0,27*	1,67 \pm 0,31*°
	2	3,00 \pm 0,27*	1,00 \pm 0,27°	2,25 \pm 0,27*^	2,00 \pm 0,27*°	1,33 \pm 0,31°^
	3	2,50 \pm 0,27*	1,00 \pm 0,27°	2,00 \pm 0,27*°	2,00 \pm 0,27*°	1,33 \pm 0,31*°
	4	2,75 \pm 0,27*	1,50 \pm 0,27°	1,75 \pm 0,27*°	2,50 \pm 0,27*°	1,75 \pm 0,27*°
Volume (ml)	1	3,75 \pm 1,06 ab	1,35 \pm 1,06	1,87 \pm 1,23	2,45 \pm 1,06	2,27 \pm 1,23
	2	2,23 \pm 1,06 a	1,35 \pm 1,06	1,28 \pm 1,06	2,08 \pm 1,06	1,93 \pm 1,23
	3	5,75 \pm 1,06 ab	2,43 \pm 1,06	1,88 \pm 1,06	5,60 \pm 1,06	1,93 \pm 1,23
	4	6,63 \pm 1,06* b	2,25 \pm 1,06°	3,25 \pm 1,06*°	3,43 \pm 1,06*°	1,93 \pm 1,23*°
Volume testicolo dx (cm ³)	1	11,98 \pm 1,68*	10,47 \pm 1,68*	19,39 \pm 1,68°	15,81 \pm 1,68*°	12,08 \pm 1,68*
	2	12,04 \pm 1,68	12,64 \pm 1,68	17,25 \pm 1,68	17,09 \pm 1,68	12,09 \pm 1,68
	3	13,01 \pm 1,68	10,75 \pm 1,68	14,28 \pm 1,68	15,76 \pm 1,68	11,84 \pm 1,68
	4	13,36 \pm 1,68*°	9,61 \pm 1,68*	17,74 \pm 1,68°	18,50 \pm 1,68°	12,03 \pm 1,68*°
Volume testicolo sx (cm ³)	1	11,24 \pm 1,83*	9,05 \pm 1,83*	18,59 \pm 1,83°	21,78 \pm 1,83°	10,03 \pm 1,83*
	2	10,40 \pm 1,83*	11,18 \pm 1,83*	17,16 \pm 1,83*°	18,48 \pm 1,83°	10,90 \pm 1,83*
	3	12,53 \pm 1,83*°	8,62 \pm 1,83*	12,21 \pm 1,83*°	17,20 \pm 1,83°	11,44 \pm 1,83*°
	4	12,87 \pm 1,83*°	8,24 \pm 1,83*	15,96 \pm 1,83°^	19,69 \pm 1,83°	12,11 \pm 1,83*^

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

I dati relativi al tempo di raccolta presentano delle differenze significative legate al primo animale che mostra valori più bassi nel secondo, nel terzo e nel quarto periodo, mentre il quinto animale ha valori più bassi solamente nel terzo e nel quarto periodo. Tali diminuzioni si ripresentano significative anche all'interno dei due soggetti stessi. I valori riferiti alla viscosità risultano significativamente più bassi per il secondo animale in tutti i diversi periodi. Il volume spermatico risulta significativamente più elevato nel primo animale durante il quarto periodo (mangime per cavalli), anche se, all'interno dello stesso soggetto diminuzioni significative si presentano nel secondo e nel quarto periodo. Per quanto riguarda il volume testicolare, sia per il destro che per il sinistro, il terzo ed il quarto animale presentano valori significativamente più alti nel primo e nel quarto periodo, mentre all'interno dei soggetti non vi sono variazioni.

4.9 Valori assoluti delle proteine, per periodo ed animale

I dati dell'analisi derivanti dai valori di peso molecolare, percentuale e valore assoluto delle proteine (ottenuti a loro volta da uno studio semiquantitativo sui gel delle elettroforesi), divisi secondo le sette fasce a

diverso peso molecolare, sono riassunti nella
Tabella n°26.

Tabella n° 26. Dati ottenuti dai valori del numero assoluto (PT) di proteine (medie \pm ESM) distribuite nelle sette fasce a diverso peso molecolare, nei diversi periodi e per i diversi animali.

		Animale					
		Periodo	Nerone - 1	Rubens - 2	Schumi - 3	Enrico - 4	El Mariachi - 5
PT1	1		0,36 \pm 0,36	1,27 \pm 0,355	0,000 \pm 0,36	0,00 \pm 0,36	0,31 \pm 0,36
	2		0,47 \pm 0,36	1,22 \pm 0,355	0,000 \pm 0,36	0,00 \pm 0,36	0,11 \pm 0,36
	3		0,27 \pm 0,36	1,35 \pm 0,355	0,155 \pm 0,36	0,31 \pm 0,36	0,25 \pm 0,36
	4		0,010 \pm 0,36	0,89 \pm 0,36	0,11 \pm 0,36	0,04 \pm 0,36	0,15 \pm 0,36
PT2	1		0,11 \pm 0,12	0,00 \pm 0,12	0,00 \pm 0,12	0,14 \pm 0,12 a	0,20 \pm 0,12
	2		0,00*	0,00 \pm 0,12*	0,00 \pm 0,12*	0,61 \pm 0,12° b	0,10 \pm 0,12*
	3		0,00 \pm 0,12	0,00 \pm 0,12	0,00 \pm 0,12	0,31 \pm 0,12 ab	0,25 \pm 0,12
	4		0,00 \pm 0,12	0,00 \pm 0,12	0,00 \pm 0,12	0,06 \pm 0,12 a	0,16 \pm 0,12
PT3	1		0,34 \pm 0,51	0,48 \pm 0,51	0,00 \pm 0,51	0,15 \pm 0,51	0,14 \pm 0,51
	2		0,29 \pm 0,51	1,19 \pm 0,51	0,00 \pm 0,51	0,55 \pm 0,51	0,06 \pm 0,51
	3		0,14 \pm 0,51	0,99 \pm 0,51	0,00 \pm 0,51	0,32 \pm 0,51	0,13 \pm 0,51

	4	0,18 ± 0,51	0,88 ± 0,51	0,00 ± 0,51	0,06 ± 0,51	1,98 ± 0,51
PT4	1	0,43 ± 0,65	2,50 ± 0,65	0,54 ± 0,65	0,00 ± 0,65	0,00 ± 0,65
	2	0,51 ± 0,65	1,43 ± 0,65	1,89 ± 0,65	0,00 ± 0,65	0,00 ± 0,65
	3	0,30 ± 0,65	1,20 ± 0,65	0,69 ± 0,65	0,00 ± 0,65	0,00 ± 0,65
	4	0,19 ± 0,65	1,07 ± 0,65	0,26 ± 0,65	0,06 ± 0,65	0,00 ± 0,65
PT5	1	0,46 ± 1,23	3,00 ± 1,23	0,00 ± 1,23	0,00 ± 1,23	0,33 ± 1,23
	2	0,19 ± 1,23	3,34 ± 1,23	1,02 ± 1,23	1,05 ± 1,23	0,13 ± 1,23
	3	0,00 ± 1,23	1,89 ± 1,23	0,25 ± 1,23	0,00 ± 1,23	0,31 ± 1,23
	4	0,09 ± 1,23	2,27 ± 1,23	0,13 ± 1,23	0,00 ± 1,23	3,87 ± 1,23
PT6	1	0,15 ± 0,61	1,24 ± 0,61	0,98 ± 0,61	0,15 ± 0,61	0,18 ± 0,61
	2	0,00 ± 0,61	1,58 ± 0,61	1,26 ± 0,61	1,10 ± 0,61	0,07 ± 0,61
	3	0,14 ± 0,61	0,76 ± 0,61	1,01 ± 0,61	0,30 ± 0,61	0,21 ± 0,61
	4	0,09 ± 0,61	1,20 ± 0,61	0,59 ± 0,61	0,10 ± 0,61	1,47 ± 0,61
PT7	1	0,16 ± 0,90*	4,01 ± 0,90°	0,48 ± 0,90*°	0,31 ± 0,90*	0,09 ± 0,90*
	2	0,29 ± 0,90	2,99 ± 0,90	1,08 ± 0,90	0,94 ± 0,90	0,04 ± 0,90
	3	0,15 ± 0,90	1,82 ± 0,90	0,40 ± 0,90	0,52 ± 0,90	0,10 ± 0,90
	4	0,10 ± 0,90	2,20 ± 0,90	0,17 ± 0,90	0,18 ± 0,90	1,37 ± 0,90

Segni uguali all'interno di ogni periodo per le diverse settimane (righe) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$). Lettere uguali nell'ambito di un singolo animale (colonne) escludono una differenza significativa ($P < 0,05$).

I dati ottenuti sono distribuiti abbastanza omogeneamente in tutte e sette le diverse fasce. Solo nella fascia a peso molecolare 2 è presente una differenza nel quarto animale, in cui esiste un valore più elevato durante il secondo periodo, significativo sia se confrontato con gli altri animali, sia all'interno dello stesso animale. Nella fascia 7, il secondo soggetto mostra valori generalmente più elevati rispetto agli altri animali, anche se la variazione risulta significativa solo per il primo periodo.

4.10 Indici di correlazione

Per completare l'analisi statistica sono state valutate le correlazioni tra i parametri di qualità del seme (tempo di raccolta, viscosità, volume spermatico, motilità e concentrazione) con i valori assoluti delle sette fasce a diverso peso molecolare. Gli indici di correlazione sono mostrati, separatamente per i cinque animali, nelle Tabelle n°27, n°28 e n°29, mentre la Tabella n°30 contiene gli indici generali di tutti e cinque i soggetti.

Tabella n° 27. Indici di correlazione tra i parametri di qualità presi in considerazione per il seme e le sette classi di proteine a diverso peso molecolare, per gli animali 1 (Nerone) e 2 (Rubens).

		RUBENS - 2											
		T. raccolta	Viscosità	Volume	Motilità	Conc.	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7
↑	T. raccolta		0,33	0,28	- 0,34	- 0,49	0,05	-	0,19	- 0,12	0,08	0,13	- 0,21
	Viscosità	- 0,17		0,26	- 0,23	- 0,40	- 0,46	-	0,06	- 0,29	- 0,14	0,00	- 0,27
	Volume	0,06	- 0,61		- 0,42	- 0,36	0,01	-	- 0,32	- 0,28	- 0,59	- 0,57	- 0,72*
	Motilità	0,12	0,46	- 0,18		0,77*	0,40	-	- 0,13	0,65	0,53	0,42	0,81*
	Conc	- 0,04	0,26	0,06	0,89*		0,25	-	- 0,62	0,79*	0,45	0,37	0,68*
	PT1	- 0,26	0,39	- 0,20	0,34	0,33		-	0,05	0,67	0,64	0,50	0,45
	PT2	- 0,12	0,27	0,09	0,87*	1,00*	0,32		-	-	-	-	-
	PT3	0,48	0,32	- 0,23	0,13	0,10	0,45	0,04		- 0,50	0,00	- 0,03	0,04
	PT4	- 0,18	0,48	- 0,18	0,34	0,37	0,96*	0,37	0,57		0,81*	0,74*	0,74*
	PT5	- 0,28	0,43	- 0,10	0,75*	0,89*	0,59	0,91*	0,20	0,67		0,97*	0,79*
	PT6	0,13	0,16	0,42	0,60	0,72*	0,13	0,73*	- 0,01	0,27	0,65		0,69
	PT7	- 0,50	0,52	- 0,08	0,27	0,36	0,87*	0,40	0,26	0,91*	0,69	0,36	
		NERONE - 1											

La lettura della tabella di correlazione va eseguita seguendo la direzione della freccia

Tabella n° 28. Indici di correlazione tra i parametri di qualità presi in considerazione per il seme e le sette classi di proteine a diverso peso molecolare, negli animali 3 (Schumi) e 4 (Enrico).

ENRICO - 4													
	T. raccolta	Viscosità	Volume	Motilità	Conc.	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7	
↑	T. raccolta	- 0,16	- 0,16	- 0,18	0,00	- 0,54	- 0,43	- 0,45	- 0,23	- 0,16	- 0,36	- 0,43	↓
	Viscosità	- 0,05	- 0,12	- 0,46	- 0,45	- 0,19	- 0,51	- 0,54	0,67	- 0,27	- 0,40	- 0,45	
	Volume	- 0,60	0,25	0,01	- 0,21	0,45	- 0,06	- 0,02	- 0,03	- 0,19	- 0,14	- 0,02	
	Motilità	0,03	- 0,60	- 0,15	0,85*	- 0,15	0,88*	0,84*	- 0,30	0,95*	0,93*	0,81*	
	Conc	0,25	0,31	- 0,35	0,41	- 0,29	0,88*	0,85*	- 0,30	0,92*	0,86*	0,87*	
	PT1	- 0,68*	0,15	0,56	- 0,49	- 0,49	0,05	0,09	- 0,01	- 0,31	- 0,18	0,04	
	PT2	-	-	-	-	-	-	1,00*	- 0,25	0,87*	0,95*	0,98*	
	PT3	-	-	-	-	-	1,00	-	- 0,25	0,83*	0,94*	0,98*	
	PT4	0,35	0,44	- 0,52	- 0,40	0,08	- 0,30	-	-	- 0,18	- 0,18	- 0,12	
	PT5	0,31	0,31	- 0,50	- 0,30	- 0,03	- 0,30	-	-	0,98*	0,94*	0,83*	
	PT6	0,33	0,62	- 0,45	- 0,62	0,15	- 0,07	-	-	0,90*	0,80*	0,92*	
	PT7	0,33	0,50	- 0,53	- 0,38	0,18	- 0,30	-	-	0,99*	0,94*	0,93*	
SCHUMI - 3													

La lettura della tabella di correlazione va eseguita seguendo la direzione della freccia

Tabella n° 29. Indici di correlazione tra i parametri di qualità presi in considerazione per il seme e le sette classi di proteine a diverso peso molecolare, nell'animale 5 (El Mariachi).

EL MARIACHI - 5												
	T. raccolta	Viscosità	Volume	Motilità	Conc.	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7
T. raccolta		0,52	0,27	-	-	0,44	- 0,04	- 0,19	-	- 0,20	- 0,20	- 0,20
Viscosità			0,62	0,00	0,00	0,25	0,10	0,24	-	0,23	0,27	0,23
Volume				0,00	-	0,51	0,53	0,14	-	0,13	0,21	0,13
Motilità					-	-	-	-	-	-	-	-
Conc						-	-	-	-	-	-	-
PT1							0,81*	- 0,59	-	- 0,58	- 0,55	- 0,59
PT2								- 0,52	-	- 0,51	- 0,46	- 0,52
PT3									-	-	-	-
PT4										-	-	-
PT5											-	-
PT6												-
PT7												-

Tabella n° 30. Indici di correlazione generali tra i parametri presi in considerazione per la qualità del seme e le sette classi di proteine a diverso peso molecolare.

	T. raccolta	Viscosità	Volume	Motilità	Conc.	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6	PT7
T. raccolta		- 0,02	- 0,15	- 0,02	- 0,09	- 0,02	- 0,07	- 0,10	0,21	- 0,01	0,23	0,13
Viscosità			0,06	- 0,42*	- 0,27	- 0,46*	0,00	- 0,22	- 0,17	- 0,30	- 0,18	- 0,41*
Volume				- 0,09	- 0,11	- 0,07	0,07	- 0,08	- 0,22	- 0,21	- 0,26	- 0,23
Motilità					0,77	0,69*	0,19	- 0,38	0,43*	0,42*	0,30	0,67*
Conc						0,44*	0,19	0,03	0,51*	0,37*	0,33	0,57*
PT1							- 0,23	0,30	0,61*	0,51*	0,35*	0,73*
PT2								- 0,05	- 0,34*	- 0,12	- 0,05	- 0,16
PT3									0,06	0,81*	0,55*	0,58*
PT4										0,54*	0,63*	0,74*
PT5											0,85	0,83
PT6												0,76*
PT7												

Dalle tabelle degli indici di correlazione si può vedere come il tempo di raccolta non correli mai significativamente con alcun parametro. La viscosità presenta correlazioni negative significative con la motilità e le PT1 e PT7, ma solamente nell'ambito degli indici riassuntivi dei cinque animali. Il volume spermatico invece correla significativamente, ed in maniera negativa, con la PT7 e solamente nel primo animale. La motilità, al contrario, correla positivamente e significativamente in tre animali e anche negli indici generali. Essa risulta correlata: alla concentrazione, oltre che negli indici generali, nel primo, nel secondo e nel terzo animale; alla fascia PT1 solo negli indici generali; alla fascia PT2 nel primo e nel quarto animale; alla fascia PT3 solo nel quarto animale; alla fascia PT4 solo negli indici generali; alla fascia PT5, oltre che negli indici generali, nel primo, nel terzo e nel quarto animale; alla fascia PT6 solo nel quarto animale e alla fascia PT7, oltre che negli indici generali, nel secondo, nel terzo e nel quarto animale. La concentrazione presenta correlazioni positive significative solamente nel primo e nel secondo animale, rispettivamente con PT2, PT5, PT4 e PT6. Negli indici generali esistono correlazioni positive della concentrazione con PT1, PT4 (come nel quarto soggetto), PT5 (come nel primo soggetto) e PT7. PT1 presenta correlazioni positive significative solo negli indici generali, con PT4, PT5, PT6 e PT7. PT2 correla anch'essa significativamente all'interno degli indici generali, ma questa volta negativamente. La stessa PT2 correla invece positivamente, nel quarto soggetto, con PT3, PT5, PT6 e PT7. Anche PT3 correla significativamente sia nel quarto soggetto che negli indici generali, ma positivamente in entrambi i casi e con le stesse fasce PT5, PT6 e PT7. PT4 correla positivamente e significativamente nel secondo e nel terzo soggetto, in entrambi con PT5, PT6 e PT7. PT5 correla positivamente e significativamente nei soggetti 3 e 4, in entrambi i casi con PT6 e PT7. Infine PT6 correla positivamente e significativamente con PT7, oltre che negli indici generali, solo nel quarto soggetto.

Per un'ulteriore possibilità di confronto tra tutti i parametri presi in considerazione durante i diversi periodi a diversa alimentazione e la qualità del seme, si sono scongelati i campioni conservati in azoto liquido. Di tali campioni è stata valutata la motilità residua degli spermatozoi post scongelamento. I risultati sono presentati nella Tabella n°31.

Tabella n° 31. Motilità percentuale post scongelamento per campioni di seme appartenenti a diversi soggetti, raccolti durante la terza e la quarta settimana di ogni periodo.

Periodo	Settimana	Animale	Motilità post scongelamento (%)
1	3	1 - Nerone	0
1	3	2 - Rubens	0
1	3	4 - Enrico	0
1	4	2 - Rubens	1
2	3	2 - Rubens	7
2	3	4 - Enrico	0
2	4	2 - Rubens	11
3	3	2 - Rubens	1
3	4	2 - Rubens	7
4	3	2 - Rubens	2
4	4	2 - Rubens	38

Si può vedere come l'unico animale a mantenere una certa motilità post scongelamento sia Rubens, il numero 2. Durante il primo ed il secondo periodo anche campioni appartenenti a Nerone ed Enrico, ovvero i soggetti 1 e 4, hanno presentato caratteristiche tali da poter essere congelati ma alcuna motilità residua è presente dopo lo scongelamento. I campioni del primo periodo sono risultati tutti privi di motilità residua, tranne un campione all'1%. Un miglioramento sembra presentarsi a partire dal secondo periodo (dieta con foraggio fresco), ma soprattutto nel terzo e nel quarto periodo (introduzione dei mangimi).

CAPITOLO IV

Discussione

Lo studio effettuato ha previsto che il gruppo di animali venisse alimentato in maniera diversa durante quattro periodi. La prima dieta presa in considerazione è di solo fieno, ovvero l'elemento base, di solito, dell'alimentazione in allevamento. La seconda ha previsto solo foraggio fresco, con gli animali mantenuti al pascolo, alimentazione che non sempre è possibile negli allevamenti a causa degli spazi o delle condizioni climatiche particolari. Il terzo ed il quarto periodo hanno previsto l'introduzione di mangime complementare, rispettivamente per ovini e cavalli, ovvero un apporto aggiuntivo di proteine, sali minerali e vitamine. Il mangime per ovini, il più diffuso negli allevamenti di piccoli camelidi data la somiglianza delle specie con le pecore, è quello più ricco in termini di integrazioni, soprattutto di origine proteica, mentre quello per cavalli integra principalmente le vitamine e apporta un'elevata quantità di zuccheri. Sulla base dei risultati ottenuti possiamo individuare se ci sono state effettivamente o meno delle variazioni, nei diversi periodi, a livello di esami biochimici ed elettroforetici, e se ciò ha comportato anche delle differenze a livello di qualità del seme. Le uniche ricerche che interconettono alimentazione e fertilità sono state svolte da Van Soun (2008). Lo studio è stato effettuato, anche in questo caso, su camelidi sudamericani, ma è incentrato sulla fertilità della femmina. In ogni caso sarà preso in considerazione come metro di paragone.

Possiamo dire che il fosforo ematico aumenta durante il primo, il secondo ed il terzo periodo, in concomitanza quindi con la dieta a base di foraggio fresco e con l'introduzione dei mangimi. E' riconosciuto che i livelli ematici di fosforo sono legati ai livelli di vitamina D, che ne facilita l'assorbimento intestinale e diminuisce le perdite urinarie. Entrambi i mangimi utilizzati sono addizionati di tale vitamina, quindi è giusto presupporre che ciò abbia comportato un aumento dei livelli sistemici di fosforo. L'aumento in corrispondenza

del secondo periodo potrebbe essere legato al fatto che gli animali sono rimasti per l'intero corso della giornata al pascolo, ed è quindi aumentata notevolmente l'esposizione solare, necessaria alla sintesi della vitamina in questione. A livello invece di plasma seminale, i valori di fosforo tendono a rimanere costanti, anche se Rubens, il soggetto 2, segue la tendenza caratteristica del plasma ematico e presenta un aumento delle quantità nel secondo, nel terzo e nel quarto periodo. Da quanto studiato da Van Soun (2008), il fosforo nella femmina sembra essere correlato negativamente con la fertilità, in quanto diete eccessivamente ricche di questo elemento compromettono l'ovulazione. Nel nostro caso invece non esistono correlazioni negative tra il fosforo ematico e la qualità del seme, esiste però, al contrario, una correlazione positiva e significativa del fosforo seminale con la motilità e la concentrazione spermatiche (pari rispettivamente a 0,651 e 0,650). Non ci sono altri riferimenti bibliografici per poter confrontare il risultato, in quanto il fosforo del plasma seminale non viene preso in considerazione nemmeno in altre specie animali di interesse zootecnico. Però, considerando anche che gli aumenti di questo macroelemento nel liquido seminale sono stati rilevanti solo nel soggetto 2, e che lo stesso soggetto presenta i migliori risultati per quanto riguarda la valutazione del seme post scongelamento, possiamo ragionevolmente pensare che, al contrario che nella femmina, il fosforo sia positivamente connesso alla fertilità maschile.

Il magnesio ematico tende a diminuire nel secondo e nel terzo periodo, soprattutto nel quinto animale, in corrispondenza dell'introduzione dei mangimi. La stessa tendenza, anche se dopo un'iniziale aumento, la troviamo per i valori del plasma seminale. Ciò potrebbe essere dovuto all'elevata assunzione di proteine, apportate con i mangimi, che ne diminuiscono l'assorbimento (come il fosforo), anche se la presenza di vitamina D ha un'azione contraria. Inoltre anche i costantemente alti livelli di calcio, come nei nostri animali, ne sfavoriscono l'assorbimento intestinale. Da Wong et al. (2001) sappiamo che il magnesio è considerato un marker per la funzionalità delle vescichette seminali, che però non esistono nei camelidi, e fa parte di alcuni complessi con funzione antiossidante. Non ci sono comunque evidenze che dimostrino una correlazione tra questo catione e la qualità del seme.

La γ -glutammina transferasi mostra delle variazioni solo a livello di plasma ematico, con un generale aumento dell'enzima all'introduzione dei mangimi. Essendo un parametro di

danno epatico, si ha una conferma del fatto che il cambio alimentare ha modificato il metabolismo del fegato e probabilmente della cistifellea, in parte sovraccaricandoli, per poter far fronte al carico alimentare. Esiste inoltre una correlazione positiva significativa tra l'enzima presente nel liquido seminale, sebbene non abbia subito variazioni, e la motilità e la concentrazione spermatiche (rispettivamente 0,555 e 0,526). Non ci sono riferimenti bibliografici a tal proposito, quindi il legame dovrà essere approfondito da ulteriori studi.

La fosfatasi alcalina, sia nel plasma ematico che in quello seminale, tende, seppur con alcune eccezioni tra i soggetti, ad aumentare nettamente con il cambio alimentare da fieno a foraggio fresco, ovvero dal primo al secondo periodo, e poi rimane tendenzialmente elevata nel terzo e quarto periodo. Questo enzima nel plasma seminale risulta importante per la capacitazione degli spermatozoi (Tang and Hoskins, 1975), che in questo studio è impossibile da verificare. È possibile in ogni caso affermare che esistono correlazioni positive e significative tra la fosfatasi alcalina seminale e la motilità e la concentrazione spermatiche (rispettivamente pari a 0.553 e 0.628).

L'alanina aminotransferasi ematica subisce aumenti significativi durante la dieta con foraggio fresco e con mangimi, soprattutto quello per ovini. Nel plasma seminale vi sono delle variazioni ma risultano essere soggettive, non sembra esserci un legame stabile con l'alimentazione. Da ciò si può dedurre, come per la γ -glutammina transferasi, che il cambio di dieta abbia portato ad un leggero sovraccarico epatico. Anche in questo caso esiste una correlazione positiva significativa tra l'enzima e la motilità del seme (0.524). Non è dato sapere il perché di questa correlazione, anzi ci si aspetterebbe il contrario visto che in genere le transaminasi sono indice di danno spermatico (Sirat et al., 1995). Un altro punto che sarebbe giusto approfondire.

Tutti i parametri del profilo energetico non subiscono variazioni, né a livello di plasma ematico, né a livello di plasma seminale. Le differenze riscontrabili sono soggettive e non sembrano avere alcun legame con l'alimentazione o con la qualità del seme. Solo i trigliceridi presentano correlazione positiva e significativa con motilità e concentrazione spermatiche (rispettivamente 0,620 e 0,587), come riscontrato anche da Georgiev (1983) e Taha et al. (2000), per i lipidi nel complesso.

I BCS rimangono tendenzialmente costanti, con un piccolo aumento dal primo al quarto periodo. Ciò è facilmente spiegabile con il maggior apporto energetico legato ai mangimi, ma non ci sono riscontri di un peggioramento della qualità del seme.

L'urea ematica mostra un significativo aumento dei valori soprattutto in corrispondenza dell'introduzione nella dieta del mangime per ovini. Lo stesso parametro nel plasma seminale non presenta variazioni. Il mangime per ovini utilizzato è particolarmente ricco di proteine (16%) e questo porta a stimolare il ciclo dell'urea per metabolizzare quelle in eccesso. Così si verifica un aumento del parametro in circolo, mentre le proteine totali rimangono costanti. Non vi sono evidenze di correlazione con la qualità del seme.

La creatinina tende a diminuire dal primo al quarto periodo a livello di plasma ematico, mentre in quello seminale non subisce variazioni degne di nota. Si può affermare comunque che, probabilmente, questa diminuzione del parametro non è legata tanto al cambio alimentare quanto al differente stile di vita degli animali. Infatti, con una dieta esclusivamente a base di fieno, sono stati costretti a rimanere negli stabulari, mentre in allevamento erano dotati di grandi spazi aperti. Questo ha forse comportato una leggera atrofia muscolare, con incremento dei livelli sistemici di creatinina, che si sono riabbassati nel momento in cui gli animali, con l'introduzione del foraggio fresco, sono stati messi al pascolo. In ogni caso non vi è alcuna relazione tra creatinina e qualità seminale.

Gli altri parametri proteici, proteine totali ed albumina, non subiscono variazioni, né per quanto riguarda il plasma ematico, né per quanto riguarda il plasma seminale. È interessante comunque notare come Rubens, il soggetto 2, abbia un valore di proteine totali nel liquido seminale costantemente più elevato degli altri maschi e fornisca contemporaneamente la migliore qualità di seme. Un discorso più ampio sulle proteine verrà comunque affrontato più avanti, discutendo le immagini ottenute dai gel di elettroforesi.

Per quanto riguarda specificatamente i parametri di qualità del seme, la viscosità non ha subito variazioni nei diversi periodi, gli animali hanno sempre mantenuto le loro soggettive particolarità. È da notare che, ancora una volta, è Rubens a possedere i valori più bassi ed il seme migliore. Inoltre dagli indici di correlazione, si evince che la viscosità correla significativamente e in modo negativo con la motilità, altro importante parametro di qualità. È d'obbligo ricordare che valori bassi corrispondono a viscosità elevate, in

quanto è stata usata la classificazione di Bravo et al. (1997) in cui 1, 2 e 3 corrispondono rispettivamente ad un liquido seminale denso, semidenso e liquido. Perciò, in realtà, viscosità e motilità sono correlati in maniera positiva.

La motilità non mostra variazioni significative nei diversi periodi. Essa comunque correla positivamente con la viscosità, come già evidenziato, ma anche con la concentrazione.

I volumi testicolari non presentano alcuna variazione significativa. Prova che i metodi di raffrescamento sono serviti ad annullare la variabilità legata all'aumento di temperatura stagionale.

Se si prendono in considerazione i risultati legati alle bande elettroforetiche, divise secondo le sette fasce a diverso peso molecolare si vede come ci sia un'omogeneità diffusa nei quattro periodi. In realtà, all'analisi qualitativa, si può notare che alcuni animali presentano effettivamente delle bande diverse in periodi diversi. Rubens ed El Mariachi (soggetti 2 e 5) sono i più omogenei nella distribuzione ed infatti costituiscono gli animali che hanno dato i campioni di qualità più costante durante i quattro periodi, anche se l'uno ha fornito seme di buona qualità e l'altro seme privo di spermatozoi. Nerone e Schumi (i soggetti 1 e 3) presentano le bande superiori ai 45 kDa in maniera costante, ma quelle a peso inferiore si presentano solo in alcune settimane di alcuni periodi senza un particolare pattern. È il soggetto 4, Enrico, a mostrare in maniera eclatante una serie di bande diverse per periodo ma ripetute nelle due settimane dello stesso periodo. La prima settimana del primo periodo (primo pozzetto) non si legge distintamente, ma sembra comunque avere un pattern molto simile alla seconda settimana del primo periodo. Tale pattern, legato in questo caso all'alimentazione con solo fieno, si ripete successivamente anche per entrambe le settimane del terzo e del quarto periodo, quindi con l'introduzione dei mangimi. Le due settimane del secondo periodo sono uguali tra di loro ma vedono l'aggiunta di una banda molto evidente nella fascia 5 (tra i 31 e i 45 kDa), evidentemente legata, in questo soggetto, ad una dieta puramente a base di foraggio fresco. Altri studi sono ovviamente necessari per definire l'origine di queste variazioni ma si può per ora affermare che le elettroforesi eseguite hanno dimostrato dei cambiamenti nel contenuto proteico del plasma seminale, in termini qualitativi e non solo quantitativi, in rapporto alla diversa alimentazione e a diversità soggettive.

Dallo studio semiquantitativo delle bande elettroforetiche si possono avanzare delle ipotesi sulla costituzione proteica del liquido seminale. Non ci sono studi approfonditi sul tipo di proteine presenti nel liquido seminale di alpaca, le ricerche più recenti si sono concentrate sull'OIF (il fattore inducente l'ovulazione), sia perché è di fondamentale importanza per migliorare le tecniche di riproduzione in questa specie, sia perché può risultare importante anche per tutte le altre specie ad ovulazione indotta. Pan et al. (2001) hanno dimostrato come questa proteina, di circa 51 kDa, abbia una struttura complessa. Considerando che tutti gli animali presentano una banda a livello della fascia 4 (da 45 a 66,2 kDa), si potrebbe dedurre che tale banda coincida effettivamente con l'OIF. Sono necessari altri studi, con metodi quantitativi più precisi e con la possibilità di isolare la proteina e verificarne il funzionamento. Inoltre bisogna tenere in considerazione che esiste un'altra proteina, l'osteopontina, ritrovata nel plasma seminale del toro, che possiede un peso molecolare di 55 kDa (Cancel et al., 1997). L'osteopontina sembra avere un ruolo importante nella protezione degli spermatozoi e non è possibile escludere che ne esista un corrispettivo anche nell'alpaca.

Proteine ad alto ed altissimo peso molecolare, che effettivamente sono presenti nei nostri campioni, non sono mai state descritte. Solamente in un recentissimo studio di Yue et al. (2009), sul plasma seminale di ariete, vengono prese in esame proteine ad alto peso molecolare, sempre attraverso l'effettuazione di elettroforesi monodimensionali. Le bande individuate in questo caso si distribuiscono dai 15 ai 116,2 kDa. Risulta che una proteina di 72,42 kDa è positivamente correlata con i parametri di qualità del seme. Proteine a peso molecolare superiore risultano correlate invece negativamente. Nei gel ottenuti nella presente ricerca è presente una banda all'interno della fascia 3 (dai 66,2 ai 97,4 kDa) nei soggetti 1, 4 e 5, ma non è possibile affermare di aver trovato correlazioni positive con i parametri di qualità. Bande invece presenti nelle fasce 1 e 2 (rispettivamente dai 116,25 ai 200 kDa e dai 97,4 ai 116,25 kDa) sono positivamente correlate con la viscosità, la motilità e la concentrazione. Oltre a ciò la fascia 1 si correla positivamente anche con il fosforo, che si è già visto influenzare la qualità del seme e che varia con la dieta, e con le proteine totali, i cui valori più elevati sono presenti nell'animale che fornisce campioni migliori.

La banda più caratteristica del secondo soggetto, Rubens, e presente solamente in alcune settimane di alcuni periodi nel primo, nel terzo e nel quarto animale, appartiene alla fascia

di peso molecolare 4 (dai 31 ai 45 kDa). Anche il quinto animale El Mariachi la mostra in tutti e quattro i periodi, ma la densità è minore. Purtroppo, non si trova alcun lavoro scientifico che parli di una proteina appartenente a tale range di peso. È importante comunque evidenziare che l'animale che presenta la banda in maniera costante e più evidente è quello che fornisce il seme migliore e che essa risulta positivamente correlata alla motilità e alla concentrazione. El Mariachi, come già descritto, non ha mai dato seme soddisfacente ma ciò è legato alla completa assenza di spermatozoi. Per quanto è dato sapere, non possiamo escludere che se l'animale riuscisse a produrre spermatozoi, questi sarebbero motili e concentrati. Altri parametri correlati positivamente sono ancora una volta il fosforo e le proteine totali.

Le proteine più studiate negli altri animali da reddito sono sicuramente quelle a peso molecolare compreso tra i 15 ed i 30 kDa. In questo studio si fa quindi riferimento alle fasce 6 e 7 (rispettivamente 14,4 ai 21,5 kDa e dai 21,5 ai 31 kDa). Proteine chiamate BSP (Bovin Seminal Protein) nel bovino, sono state individuate in quasi tutte le specie animali di interesse zootecnico (capra, pecora, bisonte, cavallo e suino), anche se le più conosciute sono quelle di bovino e ariete. Si è capito, nel bovino, che esse rivestono un ruolo importante per la motilità degli spermatozoi (Scheit et al., 1988; Manjunath et al., 1993) e mantengono stabili le membrane cellulari (Villemure et al., 2003). Un'altra famiglia di proteine con peso molecolare corrispondente (dai 12 ai 16 kDa) sono le spermadesine (ritrovate nel bovino, nella pecora e nella capra). Anch'esse sono importanti componenti del liquido seminale delle rispettive specie, in quanto diminuiscono la perossidazione lipidica e regolano la funzionalità mitocondriale, presentando quindi un contributo per quanto riguarda la motilità (Schoneck et al., 1996). Ciascuno dei nostri animali mostra la presenza di bande a livello di fascia 6 e 7 ed esiste una correlazione positiva con la viscosità, la motilità e la concentrazione. Altre correlazioni positive degne di nota si riscontrano con la fascia 1, confermando l'importanza delle bande ad alto peso molecolare, con il fosforo e le proteine totali. È interessante ricordare che le PSD e le spermadesine sono sintetizzate a livello di vescichette seminali, mancanti nei camelidi. Sarebbe quindi da approfondire la somiglianza tra queste proteine e quelle ritrovate nell'alpaca, in cui l'origine è sicuramente diversa.

Conclusioni

L'intero studio effettuato, che si è prefisso lo scopo di capire se diete diverse possano influenzare la qualità del seme e provocare cambiamenti importanti a livello di liquido seminale, ha avuto un esito da considerarsi positivo. I dati ottenuti ci permettono di dire che l'alimentazione influenza effettivamente i parametri qualitativi, agendo sui parametri del plasma ematico e del plasma seminale. Particolarmente importanti sono risultati i livelli di fosforo, vitamina D e proteine apportati con l'alimento. I gel di elettroforesi dimostrano come ci sia un legame tra la presenza di alcune proteine, ancora da identificare ma sicuramente legate ad un seme migliore, ed il tipo di dieta. Ulteriori studi sono necessari per poter meglio definire i vari meccanismi ed identificare le proteine coinvolte, soprattutto quelle ad alto peso molecolare, non riscontrate in alcun altro animale.

BIBLIOGRAFIA

Adams G.P., Ratto M.H., Huanca W., Singh J., 2005. Ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas and llamas. *Biology of Reproduction*, vol. 73, pp. 452 - 457.

Agarwal V.K., Ram L., Rai A.K., Khanna N.D., Agarwal S.P., 2004. Physical and biochemical attributes of camel semen. *Journal of Camel Science*, vol. 1, pp. 25 - 30.

Aitken R., 1984. A free radicals theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 6, pp. 19 - 24.

Aitken R.J., Vernet P., 1998. Maturation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, vol. 53, pp. 109 - 118.

Alvarez J.G., Touchstone J.C., Blasco L., Storey B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *Journal of Andrology*, vol. 8, pp. 338 - 348.

Alvarez J.G., Storey B.T., 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 42, pp. 334 - 346.

Andrabi S.M.H., 2009. Factors affecting the quality of cryopreserved buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animal*, vol. 44, pp. 552 - 569.

Assumpcao T.I., Torres Junior R.A.A., Sousa M.V., Ricart C.A.O., 2005. Correlation between fertility and levels of protein, sugar and free amino acids in seminal plasma of Nelore Bulls. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, vol. 57, pp. 55 - 61.

Aurich J.E., Kuhne A., Hoppe H., Aurich C., 1996. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. *Theriogenology*, vol. 46, pp. 791 - 797.

Julie Bakker J., Baum M.J., 2000. Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 21, pp. 220 - 262.

Bergeron A., Villemure M., Lazure C., Manjunath P., 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 71, pp. 461 - 470.

Boisvert M., Bergeron A., Lazure C., Manjunath P., 2004. Isolation and characterization of gelatin-binding bison seminal vesicle secretory proteins. *Biology of Reproduction*, vol. 70, pp. 656 - 661.

Bradley M.P., Forrester I.T., 1982. Human and ram seminal plasma both contain a Calcium-dependent regulator protein Calsemin. *Journal of Andrology*, vol. 3, pp. 289 - 296.

Bravo P.W., Johnson L.W., 1994. Reproductive physiology of the male camelid. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, vol. 10, pp. 259 - 264.

Bravo P.W., 1994. Reproductive endocrinology of llamas and alpacas. *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice*, vol. 10, pp. 265 - 279.

Bravo P.W., 1995. Physiology of reproduction and fertility evaluation in the male alpaca. *Proceedings of Post Graduate Foundation in Veterinary Science*, vol. 257, pp. 61 - 66.

Bravo P.W., Flores U., Garnica J., Ordofiez C., 1997 a. Collection of semen and artificial insemination of alpacas. *Theriogenology*, vol. 47, pp. 619 - 626.

Bravo P.W., Flores D., Ordonez C., 1997 b. Effect of repeated collection on semen characteristics of alpacas. *Biology of Reproduction*, vol. 57, pp. 520 - 524.

Bravo P.W., Skidmore J.A., Zhao X.X., 2000. Reproductive aspects and storage of semen in

Camelidae. *Animal Reproduction Science*, vol. 62, pp. 173 - 193.

Bravo P.W., 2002. *The Reproductive Process of South American Camelids*. Seagull Printing, Salt Lake City, Utah, USA.

Bravo P.W., Moscoso R., Alarcon V., Ordonez C., 2002. Ejaculatory process and related semen characteristics. *Archives of Andrology*, vol. 48, pp. 65 - 72.

Burgos C., Maldonado C., Gerez de Burgos N.M., Aoki A., Blanco A., 1995. Intracellular localization of the testicular and sperm-specific lactate dehydrogenase isoenzyme C₄ in mice. *Biology of Reproduction*, vol. 53, pp. 84 - 92.

Calvete J.J., Mann K., Schafer W., Sanz L., Reinert M., Nessau S., Raida M., Topfer-Petersen E., 1995. Amino acid sequence of HSP-1, a major protein of stallion seminal plasma: Effect of glycosylation on its heparin- and gelatin-binding capabilities. *Biochemical Journal*, vol. 310, pp. 615 - 622.

Calvete J.J., Raida M., Gentzel M., Urbanke C., Sanz L., Topfer-Petersen E., 1997. Isolation and characterization of heparin- and phosphorylcholine- binding proteins of boar and stallion seminal plasma. Primary structure of porcine pB1. *FEBS Letters*, vol. 407, pp. 201-206.

Cancel A.M., Chapman D.A., Killian G.J., 1997. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, vol. 57, pp. 1293 - 1301.

Cardozo J.A., Fernández-Juan M., Forcada F., Abecia A., Muiño-Blanco T., Cebrià-Pèrez J., 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, vol. 66, pp. 841 - 850.

Cevik M., Tuncer P.B., Tasdemir U., Ozgurtas T., 2007. Comparison of spermatological characteristics and biochemical seminal plasma parameters of normozoospermic and oligoasthenozoospermic bulls of two breeds. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, vol. 31, pp. 381 - 387.

Chandonnet I., Roberts K.D., Chapdelaine A., Manjunath P., 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 26, pp. 313 - 318.

Chauhan R.A.S., Srivastava R.K., 1973. Enzyme composition of buffalo seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 34, pp. 165 - 166.

Chipkevitch E., Nishimura R.T., Tu D.G., Galea-Rojas M., 1996. Clinical measurement of testicular volume in adolescents: comparison of the reliability of 5 methods. *Journal of Urology*, vol. 156, pp. 2050 - 2053.

Clark E.N., Corron M.E., Florman H.M., 1993. Caltrin, the calcium transport regulatory peptide of spermatozoa, modulates acrosomal exocytosis in response to the egg's zona pellucida. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268, pp. 5309 - 5316.

Corteel J.H., 1980. Effects of seminal plasma on the survival and fertility of spermatozoa kept in vitro. *Reproduction, Nutrition, Development*, vol. 20, pp. 1111 - 1123.

Cross N.L., 1998. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biology of Reproduction*, vol. 59, pp. 7 - 11.

Dacheux J.L., Gatti J.L., Dacheux F., 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microscopy Research and Technique*, vol. 61, pp. 7 - 17.

Dawson R.M.C, Mann T., White I.J., 1957. Glycerolphosphorylcholine and phosphorylcholine in semen and their relation to choline. *Biochemical Journal*, vol. 65, pp. 627 - 634.

Desnoyers L., Manjunath P., 1992. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipid. *Journal of Biology Chemistry*, vol. 267, pp. 10149 - 10155.

Diamond D.A., Paltiel H.J., DiCanzio J., Zurakowski D., Bauer S.B., Atala A., Ephraim P.L., Grant R., Retik A.B., 2000. Comparative assessment of pediatric testicular volume: orchidometer versus ultrasound. *Journal of Urology*, vol. 164, pp. 1111 - 1114.

Dimov V., Georgiev G., 1977. Ram semen prostaglandin concentration and its effect on fertility. *Journal of Animal Science*, vol. 44, pp. 1050 - 1054.

Drevet J.R., 2006. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 250, pp. 70 - 79.

Eghbali M., Alvi-Shoushtari S.M., Asri Rezaii S., 2008. Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, vol. 11, pp. 1964 - 1968.

Einspanier R., Krause I., Calvete J.J., Töpfer-Petersen E., Klostermeyer H., Karg H., 1994. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. *FEBS Letters*, vol. 344, pp. 61 - 64.

El-Manna M.M., Tingari M.D., Ahmed A.K., 1986. Studies on camel semen. II. Biochemical characteristics. *Animal Reproduction Science*, vol. 12, pp. 223 - 231.

Elwishy A.B., 1988. Reproduction in the male Dromedary (*Camelus dromedarius*): a review. *Animal Reproduction Science*, vol. 17, pp. 217 - 241.

England B.G., Foote W.C., Cardozo A.G., Matthews D.H., Riera S., 1971. Oestrus and mating behaviour in the llama (*Lama glama*). *Animal Behaviour*, vol. 19, pp. 722 - 726.

England G.C.W., 1991. Relationship between ultrasonographic appearance, testicular size, spermatozoal output and testicular lesions in the dog. *Journal of Small Animal Practices*, vol. 32, pp. 306 - 311.

Fabiani R., Johansson L., Lundkvist O., Ronquist G., 1994. Enhanced recruitment of motile spermatozoa by prostasome inclusion in swim-up medium. *Human Reproduction*, vol. 9, pp. 1485 - 1489.

Fernandez-Baca S., Madden D.H., Novoa C., 1970. Effect of different mating stimuli on induction of ovulation in the alpaca. *Journal of Reproduction Fertility*, vol. 22, pp. 261 - 267.

Flipse, R.J., 1960. Metabolism of bovine semen. IX. Glutamic-oxalo Acetic and Glutamic-pyruvic Transaminase activities. *Journal series of the Pennsylvania Agricultural Experiment Station*, vol. 2430.

Fouchècourt S., Dacheux F., Dacheux J.L., 1999. Glutathione-independent prostaglandin D₂ synthase in ram and stallion epididymal fluids: origin and regulation. *Biology of Reproduction*, vol. 60, pp. 558 - 566.

Fowler M.E., 1998. *Medicine and surgery of South American camelids: llama, alpaca, vicuña, guanaco*. Iowa State University Press, Iowa, USA.

Franco E., Sumar J., Varela M., 1981. Eyaculacion en la alpaca (*Lama pacos*). *Proceedings of IV Convencion Internacional sobre Camelidos Sudamericanos*. Corporacion Nacional Forestal. Instituto de la Patagonia, Chile, Punta Arenas.

Fry M.R., Ghosh S.S., East J.M., Franson R.C., 1992. Role of human sperm phospholipase A₂ in fertilization: effects of a novel inhibitor of phospholipase A₂ activity on membrane perturbations and oocyte penetration. *Biology of Reproduction*, vol. 47, pp. 751 - 759.

Fuse H., Takahara M., Ishii H., Sumiya H., Shimazaki J., 1990. Measurement of testicular volume by ultrasonography. *International Journal of Andrology*, vol. 13, pp. 267 - 272.

Gadella B.M., Colenbrander B., Lopes-Cardozo M., 1991. Arylsulfatases are present in seminal plasma of several domestic mammals. *Biology of Reproduction*, vol. 45, pp. 381 - 386.

Garnica J., Achata R., Bravo P.W., 1993. Physiological and biochemical characteristics of alpaca semen. *Animal Reproduction Science*, vol. 32, pp. 85 - 90.

Gavella M., Lipovac V., 1998. In vitro effect of zinc on oxidative changes in human semen. *Andrologia*, vol. 30, pp. 317 - 323.

Georgiev G.S., 1983. Biological and biochemical studies of the sperm and blood serum of rams with degraded sperm production. *Veterinarno Meditsinsky Nauki*, vol. 20, pp. 99 - 104.

Gerena R.L., Irikura D., Urade Y., Eguchi N., Chapman D.A., Killian G.J., 1998. Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biology of Reproduction*, vol. 58, pp. 826 - 833.

Glander H.J., Kratzsch J., Weisbrich C., Birkenmeier G., 1996. Insulin-like growth factor-I and alpha-2 macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. *Human Reproduction*, vol. 11, pp. 2454 - 2460.

Goncalves R.F., Bertolla R.P., Eder I., Chapman D.A., Killian G.J., 2006. Effect of frozen semen with osteopontin on in vitro bovine fertilization and embryo development. *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 19, pp. 263 - 264.

Gouletsou P.G., Galatos A.D., Leontides L.S., 2008. Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog. *Animal Reproduction Science*, vol. 108, pp. 1 - 12.

Guerin J.F., Rollet J., Perrin P., Menezo V., Orgiazzi A., Czyba J.C., 1981. Enzymes in the seminal plasma from azoospermia men: correlation with the origin of their azoospermia. *Fertility and Sterility*, vol. 36, pp. 368 - 372.

Gumbsch P., Gabler C., Holzmann A., 2002. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Veterinary Rec.*, vol. 151, pp. 140 - 144.

Gundogan M., 2006. Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi rams. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, vol. 30, pp. 95 - 100.

Gustafsson B.K., Graham E.F., Crabo B.G., Pavelko M.K., Wagner W.C., 1977. Pre-freeze supplementation of ram semen with PGE1 and PGF2alpha: effects on sperm vitality in vitro and on sperm transport in the ewe. *Proceedings Annual Meeting Society Study Reproduction*, Abstract #10.

Gwathmey T.M., Ignotz G.G., Mueller J.L., Manjunath P., Suarez S.S., 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3 and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biology of Reproduction*, vol. 75, pp. 501 - 507.

Hafez E.S.E., 1987. Semen evaluation. In: Hafez E.S.E., *Reproduction in Farm Animals*. 5th Edn. Philadelphia. Pp 455 - 480.

Harshan H.M., Sankar S., Singh L.P., Singh M.K., Sudharani S., Ansari M.R., Singh S.K., Majumdar A.C., Joshi P., 2008. Identification of PDC-109-like protein(s) in buffalo seminal plasma. *Animal Reproduction Science*, in progress.

Henricks D.M., Kouba A.J., Lackey B.R., Boone W.R., Gray S.L., 1998. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biology of Reproduction*, vol. 59, pp. 330 - 337.

Hess R.A., Zhou Q., Nie R., Oliveira C., Cho H., Nakai M., Carnes K., 2001. Estrogens and epididymal function. *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 13, pp. 273 - 283.

Hidiroglou M., Williams C.J., Tryphonas L., 1979. Zinc and manganese in accessory genital glands of male sheep: distribution, uptake and effect of testosterone. *American Journal of Veterinary Research*, vol. 40, pp. 103 - 107.

Hidiroglou M., Knipfel J.E., 1984. Zinc in mammalian sperm: a review. *Journal of Dairy Science*, vol. 67, pp. 1147 - 1156.

Hodge-Dufour J., Marino M.W., Horton M.R., 1998. Inhibition of interferon γ induced interleukin 12 production: A potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *National Academy of Sciences*, vol. 95, pp. 13806 - 13811.

Hough S.R., Parks J.E., 1994. Platelet-activating factor acetylhydrolase activity in seminal plasma from the bull, stallion, rabbit, and rooster. *Biology of Reproduction*, vol. 50, pp. 912 - 916.

Ignotz G.G., Lo M.C., Perez C.L., Gwathmey T.M., Suarez S.S., 2001. Characterization of a fucose-binding protein from bull sperm and seminal plasma that may be responsible for formation of the oviductal sperm reservoir. *Biology of Reproduction*, vol. 64, pp. 1806 - 1811.

Iqbal M., Samad H.A., Yaqub M., Najib-ur-Rehman, 1984. Comparative study of cholesterol and total lipids in semen of Nili-Ravi buffalo bulls and sahiwal bulls. *Pakistan Veterinary Journal*, vol. 4, pp. 158 - 160.

Javed M.T., Khan A., Ali M., 2000. Influence of season on seminal plasma testosterone and oestrogen on healthy and abnormal buffalo bulls and their relationship with other semen parameters. *Veterinarski Arhiv*, vol. 70, pp. 141 - 149.

Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Souza D.O., Wald V.B., Tramontina F., Mattos R.C., 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*, vol. 61, pp. 255 - 266.

Jobim M.I.M., Oberst E.R., Salbego C.G., Wald V.B., Horn A.P., Mattos R.C., 2005. BSP A1/A2-like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*, vol. 63, pp. 2053 - 2062.

Johnson L.W., 1989. Llama reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practise*, vol. 5, pp. 159 - 182.

Jonakova V., Kraus M., Veselsky L., Cechova D., Bezouska K., Tichà M., 1998. Spermadhesins of the AQN and AWN families, DQH sperm surface protein and HNK protein in the heparin-binding fraction of boar seminal plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 114, pp. 25 - 34.

Jones A.R., 1997. Metabolism of lactate by mature boar spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, vol. 9, pp. 227 - 232.

Juyena N.S., Stelletta C., 2009. Seminal Plasma: an essential attribute to spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. ANIREP-D-09-2229. Under review.

Kaya A., Aksoy M., Tekeli T., 2002. Influence of ejaculation frequency on sperm characteristics, ionic composition and enzymatic activity of seminal plasma in rams. *Small Ruminant Research*, vol. 44, pp. 153 - 158.

Killian G.J., Chapman D.A., Rogowski L.A., 1993. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, vol. 49, pp. 1202 - 1207.

Kovalski N.N., De Lamirande E., Gagnon C., 1992. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertility and Sterility*, vol. 58, pp. 809 - 816.

Kozumplik J., Vinkler A., 1982. The level of testosterone and 17-beta-estradiol in the seminal plasma of bulls and boar. *Veterinary Medicine Praha*, vol. 17, pp. 715 - 720.

Kumar A., Farooq A., 1994. Effect of oxytocin on the concentration of fructose in the accessory glands of mouse. *Life Science*, vol. 55, pp. 19 - 24.

Laemmli U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, pp. 680 - 685.

Langlais J., Roberts K.D., 1985. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. *Gamete Research*, vol. 12, pp. 183 - 224.

Lejeune H., Chuzel F., Thomas T., Avallet O., Habert R., Durand P., Saez J., 1996. Paracrine regulation of Leydig cells. *Annales d'Endocrinologie*, vol. 57, pp. 55 - 63.

Lenzi A., Picardo M., Gandini L., Dondero F., 1996. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, vol. 2, pp. 246 - 256.

Lewis-Jones D.I., Aird I.A., Biljan M.M., Kingsland C.R., 1996. Effects of sperm activity on zinc and fructose concentrations in seminal plasma. *Human Reproduction*, vol. 11, pp. 2465 - 2467.

Li S.S.L., Fitch W.M., Pan Y.C.E., Sharief F.S., 1983. Evolutionary relationships of vertebrate lactate dehydrogenase isozymes A (muscle), B (heart) and C (testis). *Journal of Biological Chemistry*, vol. 258, pp. 7029 - 7032.

Lichtenwalner A.B., Woods G.L., Weber J.A., 1996a. Ejaculatory pattern of llamas during copulation. *Theriogenology*, vol. 46, pp. 285 - 291.

Lichtenwalner A.B., Woods G.L., Weber J.A. 1996b. Seminal collection, seminal characteristics and pattern of ejaculation in llamas. *Theriogenology*, vol. 46, pp. 293 - 305.

Manjunath P., Chandonnet L., Billargeon L., Roberts K.D., 1993. Calmodulin-binding proteins in bovine semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 97, pp. 75 - 81.

Manjunath P., Thérien I., 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 53, pp. 109 - 119.

Mann T., 1964. *The biochemistry of semen and of the male reproductive tract*. Methuen & Co. Ltd. London, pp. 241

Mann T., Lutwak-Mann C., 1981. *Male reproductive function and semen*. Physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlin: Springer-Verlag. P 495.

Mann T., Parsons U., 1950. Studies on the metabolism of semen, Role of hormones, Effect of castration, Hypophysectomy and diabetes. Relation between blood glucose and seminal fructose. *Biochemical Journal*, vol. 46, pp. 440-450.

Massanyi P., Trandzik J., Nad P., Toman R., Skalicka M., Korenekova B., 2003. Seminal concentrations of trace elements in various animals and their correlations. *Asian Journal of Andrology*, vol. 5, pp. 101 - 104.

Matsuoka T., Imai H., Asakuma S., Kohno H., Fukui Y., 2006. Changes of fructose concentrations in seminal plasma and glucose and testosterone concentrations in blood plasma in rams over the course of a year. *Journal of Reproduction and Development*, vol. 52, pp. 805 - 810.

Meizel S., 1997. Amino acid neurotransmitter receptor/chloride channels of mammalian sperm and the acrosome reaction. *Biology of Reproduction*, vol. 56, pp. 569 - 574.

Melo L.M., Teixeira D.I., Havt A., Silva da Cunha R.M., Martins D.B., Castelletti C.H., Eleutério de Souza P.R., Filho J.L., Freitas V.J., Cavada B.S., Ràdis-Baptista G., 2007. Buck (*Capra hircus*) genes encode new members of the spermadhesin family. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 75, pp. 8 - 16.

Mènard M., Nauc V., Lazure C., Vaillancourt D., Manjunath P., 2003. Novel purification method for mammalian seminal plasma phospholipid- binding proteins reveals the presence of a novel member of this family of protein in stallion seminal fluid. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 66, pp. 349 - 357.

Miao Z.R., Lin T.K., Bongso T.A., Zhou X., Cohen P., Lee K.O., 1998. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. *Clinical Endocrinology*, vol. 49, pp. 235 - 239.

Montamat E.E., Blanco A., 1976. Subcellular distribution of the lactate dehydrogenase isozyme specific for testis and sperm. *Experimental Cell Research*, vol. 103, pp. 241 - 245.

Mosaferi S., Niasari-Naslaji A., Abarghani A., Gharahdaghi A.A., Gerami A., 2005. Biophysical and biochemical characteristics of Bactrian camel semen collected by artificial vagina. *Theriogenology*, vol. 63, pp. 92 - 101.

Muiño-Blanco T., Pèrez-Pè R., Cebrià-Pè J.A., 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reproduction of Domestic Animal*, vol. 43 (Supplement 4), pp. 18 - 31.

Neumark H., Schindler H., 1967. Amino acids, amines and peptides of ram epididymal semen. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 14, pp 469 – 471.

Novoa C., 1970. Reproduction in Camelidae. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 22, pp. 3 - 20.

Pan G., Chen Z., Liu X., Li D., Xie Q., Ling F., Fang L., 2001. Isolation and purification of the ovulation-inducing factor from seminal plasma in the Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). *Theriogenology*, vol. 55, pp. 1863 - 1879.

Paolicchi F., Urquieta B., Del Valle L., Bustos-Obregon E., 1999. Biological activity of the seminal plasma of alpacas: stimulus for the production of LH by pituitary cells. *Animal Reproduction Science*, vol. 54, pp. 203 - 210.

Pesch S., Bergmann M., Bostedt H., 2006. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. *Theriogenology*, vol. 66, pp. 307 - 313.

Pickett B.W., Komarek R.J., 1966. Lipid and dry weight of bovine seminal plasma and spermatozoa from first and second ejaculates. *Journal Dairy Science*, vol. 50, pp. 742 - 746.

Pineda M.H., 1995. Male reproductive system. *McDonald's Veterinary Endocrinology And Reproduction*. 5th Edn. P 216.

Purohit S.B., Laloraya M., Kumar G.P., 1999. Role of ions and ion channels in capacitation and acrosome reaction of spermatozoa. *Asian Journal of Andrology*, vol. 1, pp. 95 - 107.

Rao B.R., Jairam B.T., Pandey J.N., 1984. Dehydrogenase activities of ram seminal plasma. *Indian Veterinary Journal*, vol. 61, pp. 171 - 173.

Reddy E.S.P., Bhargava P.M., 1979. Seminalplasmin - an antimicrobial protein from bovine seminal plasma which acts in E. coli by specific inhibition of rRNA synthesis. *Nature*, vol. 279, pp. 725 - 728.

Robertson S.A., Ingman W.V., O'Leary S., Sharkey D.J., Tremellen K.P., 2002. Transforming growth factor β - α mediator of immune deviation in seminal plasma. *Journal of Reproductive Immunology*, vol. 57, pp. 109 - 128.

Robertson S.A., Sharkey D.J., 2001. The role of semen in the induction of maternal immune tolerance to pregnancy. *Immunology*, vol. 13, pp. 243 - 254.

Roy A., 1957. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. *Nature*, vol. 179, pp. 189 - 190.

Sanchez-Luengo S., Aumuller G., Albrecht M., Sen P.C., Rohm K.H., Wilhelm B., 2004. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Andrology*, vol. 25, pp. 234 - 244.

Sanchez-Partida L.G., Windsor D.P., Eppleston J., Setchell B.P., Maxwell W.M.C., 1999. Fertility and its relationship to motility characteristics of spermatozoa in ewes after cervical, transcervical, and intrauterine insemination with frozen-thawed ram semen. *Journal of Andrology*, vol. 20, pp. 280 - 288.

Sanz L., Calvete J.J., Mann K., Gabius H.J., Topfer-Petersen E., 1993. Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: a dual role for spermadhesins in fertilization. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 35, pp. 37 - 43.

Scheit K.H., Shivaji S., Bhargava P.M., 1985. Seminalplasmin, an antimicrobial protein from bull seminal plasma, inhibits growth, and synthesis of nucleic acids and proteins in *S. cerevisiae*. *Journal of Biochemistry*, vol. 97, pp. 463 - 471.

Scheit K.H., Kemme M., Aümüller G., Seitz J., Hagendorff G., Zimmer M., 1988. The major protein of bull seminal plasma : biosynthesis and biological function. *Bioscience Reports.*, vol. 8, pp. 589 - 608.

Schoneck C., Bmun I.J., Einspanier R., 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*, vol. 45, pp. 633 - 642.

Schwalm A., Gauly M., Erhardt G., Bergmann M., 2007. Changes in testicular histology and sperm quality in llamas (*Lama glama*), following exposure to high ambient temperature. *Theriogenology*, vol. 67, pp. 1316 - 1323.

Scott T.W., Dawson R.M.C., 1968. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. *Biochemical Journal*, vol. 108, pp. 457 - 463.

Setchell B.P., Brooks D.E., 1988. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. Knobil E., Neill J., *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York. Pp 753 - 836.

Shivaji S., Scheit K.H., Bhargava P.M., 1989. *Proteins of seminal plasma*. John Wiley & Sons. New York. Pp 331 - 356.

Shore L., Yehuda R., Marcus S., Bartoov B., Shemesh M., 2003. Effect of hCG injection on prostaglandin E concentrations in ram seminal plasma. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, vol. 70, pp. 291 - 301.

Sias B., Ferrato F., Pellicer-Rubio M.T., Forgerit Y., Guillouet P., Leboeuf B., Carriere F., 2005. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1686, pp. 169 - 180.

Sidhu K.S., Guraya S.S., 1989. Calmodulin-like protein in buffalo (*Bubalus bubalis*) seminal plasma and its effect on sperm Ca^{++} , Mg^{++} -ATPase. *International Journal of Andrology*, vol. 12, pp. 148 - 154.

Sidhu K.S., Gill H.K., 1992. Immunoreactive prolactin, progesterone and luteinizing hormone in the seminal plasma of buffalo (*Bubalus bubalis*). *Acta Veterinaria Hungarica*, vol. 40, pp. 27 - 32.

Singh B., Mahapatro B.B., Sadhu D.P., 1969. Chemical composition of cattle and buffalo spermatozoa and seminal plasma under different climatic conditions. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 20, pp. 175 - 178.

Sirat M.P., Sinna A.K., Singh B.K., Prasad R.I., 1995. Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, vol. 45, pp. 405 - 416.

Sitaram N., Subbalakshmi C., Krishnakumari V., Nagaraj R., 1997. Identification of the region that plays an important role in determining antibacterial activity of bovine seminalplasmin. *FEBS Letters*, vol. 400, pp. 289 - 292.

Skandhan K.P., 1992. Review on copper in male reproduction and contraception. *Revue Francaise de Gynecologie ed Obstetrique*, vol. 87, pp. 594 - 598.

Smith B.B., 1999. Overview of reproduction in the male llama and alpaca. *Proceedings of the Society for Theriogenology*, pp. 191 - 196.

Smith J.F., Parr J., Murray G.R.M., McDonald R.M., Lee R.S.F., 1999. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. *Proceedings of NZ Society of Animal Reproduction*, vol. 59, pp. 223 - 225.

Souza C.E.A., Moura A.A., Monaco E., Killian G.J., 2008. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins A1 / A2, 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. *Animal Reproduction Science*, vol. 105, pp. 72 - 89.

Storey B., Alvarez J.G., Thompson K.A., 1998. Human sperm glutathione reductase activity in situ reveals limitation in the glutathione antioxidant defense system due to supply of NADPH. *Molecular Reproduction and Development*, vol. 49, pp. 400 - 407.

Suarez S.S., Dai X.B., DeMott R.P., Redfern K., Mirardo M.A., 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *Journal of Andrology*, vol. 13, pp. 75 - 80.

Sumar J., 1983. Studies on reproductive pathology in alpacas. Faculty of Veterinary Medicine Uppsala, Sweden, University of Agricultural Sciences: 90.

Sumar J., Adams G.P, 2007. Reproductive anatomy and life cycle of the male and female llama and alpaca. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2*, chap. 15, pp 855 - 865.

Taha T.A., Abdel-Gawad E.I., Ayoub M.A., 2000. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions. 2 - Biochemical and enzymatic properties of seminal plasma. *Animal Science*, vol. 71, pp. 325 - 332.

Tang F.Y., Hoskins D.D., 1975. Phosphoprotein phosphatase of bovine epididymal spermatozoa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 62, pp. 328 - 335.

Teixeira D.I., Cavada B.S., Sampaio A.H., Havt A., Bloch J.C., Prates M., Moreno V., 2002. Isolation and partial characterization of a protein from buck seminal plasma (*Capra hircus*), homologous to spermadhesins. *Protein and Peptide Letters*, vol. 9, pp. 331 - 335.

Teixeira D.I.A., Melo L.M., Gadelha C.A.A., Da Cunha R.M.S., Bloch Jr C., Rádis-Baptista G., Cavada B.S., De Figueirêdo Freitas V.J., 2006. Ion-exchange chromatography used to isolate a spermadhesin-related protein from domestic goat (*Capra hircus*) seminal plasma. *Gene. Mol. Res.*, vol. 5, pp. 79 - 87.

Therien I., Moreau R., Manjunath P., 1998. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biology of Reproduction*, vol. 59, pp. 768 - 776.

Thompson J., Meyer H., 1994. Body condition scoring of sheep. Oregon State University Extension Service.

Tienthai P., Suzuki K., Pertoft H., Kjellen L., Rodriguez-Martinez H., 2000. Production of glycosaminoglycans by the porcine oviduct in relation to sperm storage. *Reproduction of Domestic Animal*, vol. 35, pp. 167 - 170.

Töpfer-Petersen E., Romero A., Varela P.F., Ekhlasi-Hundrieser M., Dostalova Z., Sanz L., Calvete J.J., 1998. Spermadhesins: a new protein family. Facts, hypotheses and perspectives. *Andrologia*, vol. 30, pp. 217 - 224.

Tremblay R.R., Demers P., Besançon J., Lemay J.P., 1990. Alpha-1,4-glucosidase activity in ram seminal plasma is inversely related to serum testosterone. *Enzyme*, vol. 43, pp. 107 - 111.

Tummaruk P., Lundeheim N., Einarsson S., Dalin A.M., 2000. Reproductive performance of purebred Swedish Landrace and Swedish Yorkshire sows: II, Effect of mating type, weaning-to-firstservice interval and lactation length. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A - Animal Science*, vol. 50, pp. 217 - 224.

Upreti G.C., Hall E.L., Koppens D., Olivier J.E., Vishwanath R., 1999. Studies on the measurement of phospholipase A2 (PLA2) and PLA2 inhibitor activities in ram semen. *Animal Reproduction Science*, vol. 56, pp. 107 - 121.

Van Saun R.J., 2008. Effect of nutrition on reproduction in llamas and alpacas. *Theriogenology*, vol. 70, pp. 508 - 514.

Vera O., Vàsquez L.A., Muñoz M.G., 2003. Semen quality and presence of cytokines in seminal fluid of bull ejaculates. *Theriogenology*, vol. 60, pp. 553 - 558.

Villemure M., Lazure C., Manjunath P., 2003. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. *Reproductive Biology and Endocrinology*, vol. 1, pp. 39 - 48.

Wempe F., Wagner S., Kammer H., Krauhs E., Scheit K.H., 1990. Seminalplasmin, the major basic protein of bull seminal plasma, is a secretory protein of the seminal vesicles. *Biochimical and Biophysical Acta*, vol. 1034, pp. 260 - 262.

Wong W.Y., Flik G., Groenen P.M.W., Swinkels D.W., Thomas C.M.G., Copius-Peereboom J.H.J., Merkus H.M., Steegers-Theunissen R.P.M., 2001. The impact of calcium, magnesium, zinc and copper in blood and SP on semen parameters in men. *Reproductive Toxicology*, vol. 15, pp. 131 - 136.

Xu Z.Z., McDonald M.F., McCutcheon S.N., Blair H.T., 1991. Seasonal variation in testis size, gonadotropin secretion and pituitary responsiveness to GNRh in rams of 2 breeds differing in time of onset of the breeding-season. *Animal Reproduction Science*, vol. 26, pp. 281 - 292.

Yanagimachi R., 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*, vol. 3, pp. 371 - 372.

Yu B., Zhao Y., Zhao W., Chen F., Liu Y., Zhang J., Fu W., Zong Z., Yu A., Guan Y., 2003. The inhibitory effect of BSP-A1/-A2 on protein kinase C and tyrosine protein kinase. *Cell Biochemistry and Function*, vol. 21, pp. 183 - 188.

Yuan Y.Y., Chen W.Y., Shi Q.X., Mao L.Z., Yu S.Q., Fang X., Roldan E.R.S., 2003. Zona pellucida induces activation of phospholipase A₂ during acrosomal exocytosis in Guinea pig spermatozoa. *Biology of Reproduction*, vol. 68, pp. 904 - 913.

Yue W., Shia L., Baia Z., Rena Y., Zhao Y., 2009. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. *Animal Reproduction Science*, in progress.

Zedda M.T., Bini P.P., Pau S., Sbernadori U., 1996. Constituents of seminal plasma and blood serum of the ram. *Journal of Biology Research*, pp. 227 - 230.

Zinkham W.H., Blanco A., Kupchuk L., 1963. Lactate dehydrogenase in testis: Dissociation and recombination of subunits. *Science*, vol. 142, pp. 1303 - 1304.

Zubkova E.V., Robaire B., 2004. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymes, seminal vesicles and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biology of Reproduction*, vol. 71, pp. 1002 - 1008.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare innanzitutto la mia famiglia, i miei genitori, mia sorella e il mio fidanzato, nonché i miei amici, per il sostegno che mi hanno dimostrato, anche nei momenti più difficili.

Ringrazio il Dott. Calogero Stelletta per la sua disponibilità e la fiducia sempre accordatami, la Dott.ssa Nasrin Juyena per il suo prezioso aiuto e la Dott.ssa Antonella Calabria per i suoi consigli.

Ringrazio per l'interessamento e l'aiuto i nostri tecnici di laboratorio Paolo Zucchini e Silvia Bedin, il Dott. Vanni Ferrari, la Dott.sa Mara Vegro, il tecnico addetto alle scuderie Franco Rossetto ed i ragazzi e le ragazze che nel tempo hanno prestato servizio negli stabulari.