



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

SCUOLA DI DOTTORATO IN

RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI

ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Direttore: Prof. Sergio Ledda

INDIRIZZO: Riproduzione, produzione e benessere animale (XXV CICLO)

**NUOVI APPROCCI PER LA VALUTAZIONE
DELLA QUALITA' DEI GAMETI**

Docente Guida

Prof. Salvatore Naitana

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato della

Dr.ssa Valentina Satta

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. I MARCATORI PROTEOMICI.....	1
1.2. MARCATORI METABOLOMICI	2
2. STUDIO DELLA PROTEOMICA: ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE	2
2.1. LA PROTEOMICA NELLA VALUTAZIONE DEL SEME	13
3. STUDIO DELLA METABOLOMICA: ELETTROFORESI CAPILLARE	18
3.1. RILEVATORE A FLUORESCENZA LASER-INDOTTA.....	22
3.2. RIVELATORE DI MASSA	26
4. SCOPO GENERALE	32
5. ESPERIMENTO 1: VALUTAZIONE DEL METABOLOMA DEL PLASMA SEMIALE IN ARIETI IPOFERTILI TRATTATI CON MELATONINA	33
5.1. SCOPO	35
5.2. MATERIALI E METODI.....	35
5.3. RISULTATI	38
5.4. DISCUSSIONE.....	44
6. ESPERIMENTO 2: DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE BIOCHIMICO-FISIOLOGICHE DI EIACULATI DI STALLONI IN RELAZIONE ALL'ETÀ DELL'ANIMALE	50
6.1. SCOPO	54
6.2. DISCUSSIONE.....	58
6.3. CONCLUSIONI.....	63

7. ESPERIMENTO 3: VALUTAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI ATP E DEL PROTEOMA NEL PLASMA SEMINALE DI STALLONI IPOFERTILI	64
7.1. SCOPO	64
7.2. MATERIALI E METODI.....	64
7.3. RISULTATI	66
7.4. DISCUSSIONE.....	71
7.5. CONCLUSIONI.....	74
8. ESPERIMENTO 4: DETERMINAZIONE DI FATTORI MOLECOLARI CORRELATI ALLA COMPETENZA ALLO SVILUPPO DELL'OOCITA DI OVINO.	75
8.1. SCOPO	77
8.2. MATERIALI E METODI.....	77
8.3. RISULTATI	81
8.4. DISCUSSIONE.....	86
9. CONCLUSIONI	90
10. BIBLIOGRAFIA	92

1. INTRODUZIONE

L'utilizzo di tecniche innovative di genomica, proteomica e metabolomica sono sempre più considerate la chiave per una maggiore accuratezza nella diagnosi e nel trattamento dei problemi di fertilità e nell'applicabilità delle tecnologie riproduttive, ed è in questi campi che si sta orientando la ricerca di potenziali biomarcatori (Lamb, 2009). Per biomarcatore si intende un ben preciso indicatore biologico o derivato biologicamente, di un processo, un evento o di una condizione che può essere oggettivamente misurata, valutata e comparata. Il marcatore ideale deve identificare anomalie in stadi precoci, deve essere facilmente individuabile, deve avere costi contenuti ed un elevato grado di accuratezza, non deve essere influenzato significativamente da altri fattori.

1.1. I MARCATORI PROTEOMICI

La proteomica studia la struttura e la funzione di proteine con lo scopo di esaminare l'espressione delle proteine totali e le loro modificazioni come complemento alla genomica, in relazione al fatto che non tutti gli mRNA vengono trascritti, per cui l'espressione genica può essere differente dall'espressione proteica, specialmente in relazione a differenti stati fisiologici (Milardi et al, 2012, marker oocita). Questo suggerisce che le analisi proteomiche hanno il potenziale di fornire marcatori maggiormente accurati. Per esempio, l'analisi del materiale seminale ha portato alla conoscenza di numerose proteine potenziali marcatori di tumori alla prostata (Banez et al, 2005) o di vari problemi a livello testicolare ed epididimale (Batruch et al, 2011). I clinici generalmente relazionano la fertilità con le analisi del seme o con le percentuali di maturazione dell'ocita e di sviluppo embrionale che spesso non sono dei marcatori efficienti per poter effettuare una diagnosi. L'analisi proteomica può confermare la presenza di una data proteina, quantificarla e rivelare forme proteiche attivate, fosforilate, ubiquitinate, metilate, acetilate, glicosilate, ossidate e/o nitrosilate (Milardi et al, 2012). Con questa miriade di variabili è facile prevedere come la tecnologia proteomica possa essere un potente mezzo per la diagnosi di infertilità maschile e femminile. Il continuo incremento delle tecnologie proteomiche, lo sviluppo e l'applicazione di nuove tecniche di preparazione del campione e recenti miglioramenti delle strumentazioni rendono oggi possibile l'individuazione e la quantificazione di proteine coinvolte nelle patologie riproduttive. Le tecnologie proteomiche maggiormente utilizzate per indagare patologie riproduttive includono l'elettroforesi

su gel, in particolar modo l'elettroforesi bidimensionale, recentemente associata a tecniche di spettrometria di massa (Meehan et al, 2010).

1.2. MARCATORI METABOLOMICI

Lo studio di prodotti cellulari metabolici come potenziali biomarcatori di infertilità maschile o femminile è ancora ai primi passi. La metabolomica è lo studio di piccoli metaboliti a basso peso molecolare che sono i prodotti del metabolismo (Nicholson, 2008; Deepinder et al, 2007). La funzione fisiologica di queste piccole molecole abbraccia un ampio orizzonte comprendendo crescita, sviluppo e riproduzione (Nicholson e Lindon 2008). I metaboliti possono essere intrinseci, risultanti dall'influenza di fattori esogeni, riflettere eventi successivi all'espressione genica e sono considerati una rappresentazione reale del fenotipo attuale di una cellula rispetto alla proteomica o alla genomica (Deepinder et al, 2007). Questa tecnologia permette l'analisi differenziale dei livelli di un elevato range di molecole endogene ed esogene e ha mostrato un grande impatto sull'investigazione dello status fisiologico, la diagnosi di patologie, la scoperta di biomarcatori e l'identificazione di vie metaboliche alterate da patologie o trattamenti farmacologici (Zhang et al, 2012). Il vantaggio, rispetto alla diagnostica classica, è quello di basarsi sulla scoperta di una gamma di biomarcatori rilevanti dal punto di vista clinico, i cui livelli sono alterati simultaneamente. Da un punto di vista metodologico, la tecnica maggiormente utilizzata è storicamente la Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), ma recentemente sono utilizzati con sempre maggior frequenza, sistemi di separazione molecolare, quali l'elettroforesi capillare, affiancata a rilevatori di massa (Garcia-Villalba, 2008).

2. STUDIO DELLA PROTEOMICA: ELETTROFORESI BIDIMENSIONALE

Negli ultimi anni la costante ricerca e l'avanzamento della tecnologia hanno permesso di continuare a migliorare la qualità dei dati ottenuti nel campo della genomica; tutto ciò ha portato alla determinazione delle sequenze di molti geni che compongono il DNA degli esseri viventi e ad un aumento continuo dei dati reperibili nei vari database. Lo sviluppo della genomica, a sua volta, ha aperto la strada ad un altro ramo relativo alla ricerca biomedica, ovvero la proteomica (Wilkins M et al, 2006). Per proteomica si intende l'approccio sperimentale che permette di decodificare le informazioni derivanti dalla genomica, identificando la proteina codificata dalla sequenza di un particolare gene e determinandone struttura, funzione e possibili modificazioni post-trasduzionali. Le proteine sono macromolecole complesse e senza dubbio sono tra i

più importanti composti biologici presenti nell'organismo; le loro funzioni sono altrettanto notevoli e uniche: possono fungere da enzimi, recettori, anticorpi, ormoni, sono coinvolte nel meccanismo di espressione dei geni, nel trasporto e nello stoccaggio di piccole molecole. Quando si prende in considerazione una cellula o un'unità sub-cellulare, un tessuto, od un organo, è possibile definirne il proteoma, ovvero l'insieme completo di tutte le proteine che sono espresse in quel particolare sito relativamente a specifiche condizioni fisiologiche e ambientali. La proteomica è fondamentale perché la genetica e la genomica sono insufficienti a descrivere in modo esauriente i vari processi biologici. La genomica, di fatto, è un sistema statico e risulta identico in ogni cellula o organismo, tenendo naturalmente in considerazione le possibili variazioni inter-specie; il proteoma, invece, è altamente dinamico poiché il tipo di proteina, la sua abbondanza, la sua localizzazione all'interno di un tessuto, il tipo e la quantità di modificazioni post-trasduzionali, dipendono fortemente dall'ambiente e dallo stato fisiologico in cui si vengono a trovare le cellule. Mentre la genomica fornisce informazioni limitatamente alla sequenza di un gene, la proteomica è in grado di fornire un'immagine più dettagliata della realtà poiché considera non solo la proteina che deriva da un certo gene, ma anche le sue modificazioni dovute all'interazione con la matrice biologica in cui è espressa. Una modificazione post traduzionale è la modificazione chimica di una proteina in seguito alla sua traduzione; alcuni residui amminoacidici, infatti, possono essere modificati attraverso l'aggiunta di gruppi funzionali (acetile, fosfato, lipidici o glucidici), in modo da determinare la funzionalità complessiva della proteina stessa.

L'analisi proteomica è un campo molto vasto e solitamente viene suddiviso in tre sottoclassi: la proteomica di caratterizzazione che si occupa di definire le proteine presenti in una cellula, tessuto o fluido biologico; la proteomica differenziale che studia il tipo e la quantità di proteine che si trovano in uno stesso tessuto, ma in condizioni fisiologiche diverse; la proteomica funzionale il cui scopo è l'identificazione di un gruppo di proteine che svolgono la stessa funzione (Dass, 2007). Tra le tecnologie disponibili per lo studio del proteoma, l'Elettroforesi Bidimensionale (Two-Dimensional Polyacrylamide gel Electrophoresis, 2D-PAGE) rappresenta la tecnica di elezione, perché attualmente è l'unica che consente di separare migliaia di proteine contemporaneamente e su di un unico gel con una risoluzione ed una riproducibilità adeguata (Görg et al, 2004). La comprensione del network delle proteine e delle loro variazioni quantitative in un contesto globale, come può essere quello di un estratto cellulare, dipende fortemente dalla capacità di analizzare le proteine contemporaneamente e di riuscire a quantificarne le variazioni nell'espressione (Marcus et al, 2009). Si definisce bidimensionale poiché l'insieme delle proteine, presenti in un campione, vengono separate mediante due processi distinti e orientati

tra loro perpendicolarmente (Gidding et al, 1984). L'elettroforesi bidimensionale è un'ottima tecnica per separare una miscela complessa di proteine, derivanti da un campione biologico. Il processo prevede due fasi distinte, ognuna della quali sfrutta delle proprietà caratteristiche della proteina per ottenere la separazione. La separazione relativa alla prima dimensione è eseguita in modalità di focalizzazione isoelettrica (IEF), per cui le proteine sono differenziate grazie ad un gradiente di pH e ad un campo elettrico opportuno, in base al valore del loro punto isoelettrico; la seconda dimensione, invece, separa le proteine in base al loro peso molecolare, ovvero usando una SDS-PAGE. Questa serie di separazioni ortogonali è in grado di differenziare in un unico esperimento le centinaia di proteine contenute in una miscela complessa, per fornire come risultato un'immagine a due dimensioni. Nell'elettroforesi bidimensionale le proteine vengono difatti inizialmente separate secondo il loro punto isoelettrico (prima dimensione) e successivamente secondo la loro massa molecolare (seconda dimensione) (Fig. 1).

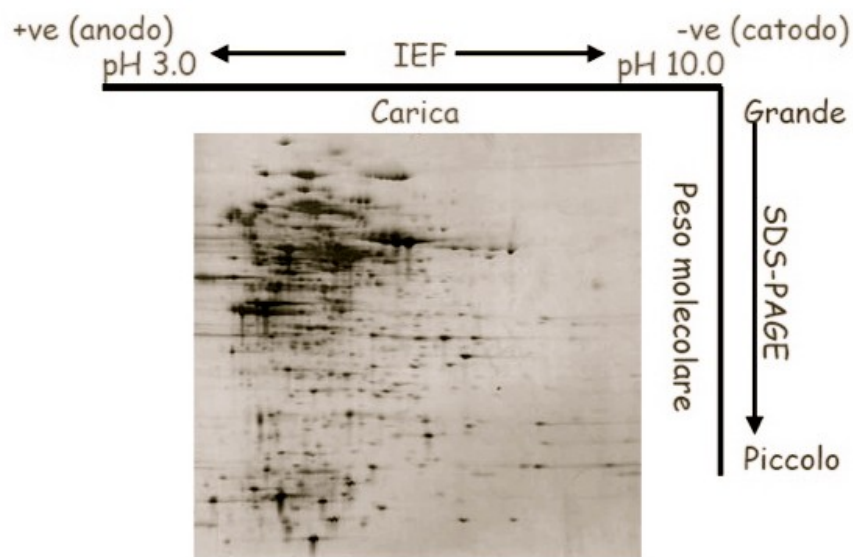


Figura 1. Schema dell'Elettroforesi Bidimensionale (2D-SDS PAGE). Prima dimensione secondo i pI (punti isolettrici), definita Isoelettrofocusing (IEF); Seconda dimensione in base ai mW (pesi molecolari), definita SDS-PAGE (Polyacrylamide gel electroforesis in SDS buffer).

Questa tecnica, che inizialmente prevedeva l'uso di anfoliti carrier per la formazione di un gradiente di pH (O'Farrel, 1975), è stata successivamente migliorata con l'avvento delle immobiline, le quali hanno permesso l'ottenimento di un gradiente di

pH immobilizzato nel gel. L'introduzione di tali gradienti in IEF ha permesso un notevole passo migliorativo della tecnica, con rese superiori di riproducibilità e risoluzione. Per molti anni, difatti, la tecnica non aveva riscontrato successo a causa della scarsa riproducibilità che rendeva praticamente impossibile il confronto tra analisi di laboratori differenti e della resa di risoluzione che risultava ottimale solo per piccole quantità di proteine. Tutto ciò era essenzialmente dovuto alla presenza di anfoline (sostanze anfotere) nella corsa in prima dimensione, utilizzate per generare il gradiente di pH desiderato. L'introduzione del metodo IPG (strip di gel in gradiente di pH immobilizzato) (Bjellqvist et al, 1982) ha consentito dunque di rendere stabile il gradiente di pH, polimerizzato insieme alla matrice di acrilamide, fino a pH 12 (Görg et al, 2000), e di analizzare fino a 12 mg di proteine in prima dimensione. L'alta capacità di carico proteico ha così permesso attualmente di poter caratterizzare i singoli spot, ottenuti in 2D-IPG-PAGE, mediante varie e sofisticate tecniche microchimiche (spettrometria di massa, sequenziamento amminoacidico, microsequenziamento N-terminale). L'introduzione dei gradienti immobilizzati nella prima dimensione dell'elettroforesi bidimensionale, dunque, ha consentito di avere un'altissima riproducibilità dei risultati tra laboratori differenti, consentendo la costruzione per comparazione di gel diversi di mappe elettroforetiche di riferimento (Map Master) catalogabili in banche dati specifiche (ad esempio Swiss-2DPAGE, Siena-2DPAGE).

Grazie alla quantità di informazioni ottenibili, l'elettroforesi bidimensionale attualmente ha assunto un ruolo importante nella ricerca medico-scientifica e si sta affermando come metodo "high throughput", ovvero "su larga scala".

L'elettroforesi bidimensionale, quindi, è utile per separare le molte proteine espresse in una cellula o in un tessuto, ma sebbene sia una tecnica molto usata, possiede molte limitazioni. Prima di tutto richiede un lavoro non indifferente, l'ottenimento di risultati validi, per un solo campione, può richiedere anche un'intera settimana per la messa a punto del metodo, e non può essere automatizzata. La tecnica, inoltre, non è adatta per processare contemporaneamente proteine molto piccole o molto grandi, ed in modo analogo è difficile separare proteine troppo acide o troppo basiche; anche la solubilità limitata delle proteine idrofobiche è un problema. In aggiunta a tutto questo, la metodica risulta complicata ed è molto difficile ottenere dei dati riproducibili, anche operando con la massima cura e attenzione (Ong et al, 2001).

Prima dimensione – Isoelettrofocalizzazione su gradiente di pH immobilizzato

L'isoelettrofocalizzazione (IsoElectric Focusing, IEF) è un metodo di separazione delle proteine che, sfruttando la loro carica elettrica, permette di separarle in base al loro punto isoelettrico (pI). Le proteine sono delle molecole anfotere, cioè sono molecole che variano la loro carica a seconda del pH del mezzo in cui esse si trovano. Quando si analizza una miscela proteica con questo metodo, le proteine tenderanno a migrare verso l'anodo o verso il catodo a seconda della loro carica netta. Quest'ultima è definita come la somma di tutte le cariche positive e negative di tutti gli amminoacidi formanti la catena polipeptidica (Westermeier et al, 2001). Per definizione il punto isoelettrico di una proteina coincide con il valore di pH in cui la proteina ha carica netta uguale a zero. Quindi una proteina sarà caricata positivamente a valori di pH inferiori al suo punto isoelettrico, mentre lo sarà negativamente a quelli superiori. Una proteina posta in un gradiente di pH sotto l'influenza di un campo elettrico si muoverà verso il suo punto isoelettrico, in cui avrà carica netta uguale a zero. Fino a quando è applicato un campo elettrico l'effetto della diffusione delle proteine non sarà presente in quanto alla diffusione si oppone la forza elettromotrice che riporta ogni proteina al suo punto isoelettrico ottenendo così bande molto ben risolte (Fig. 2).

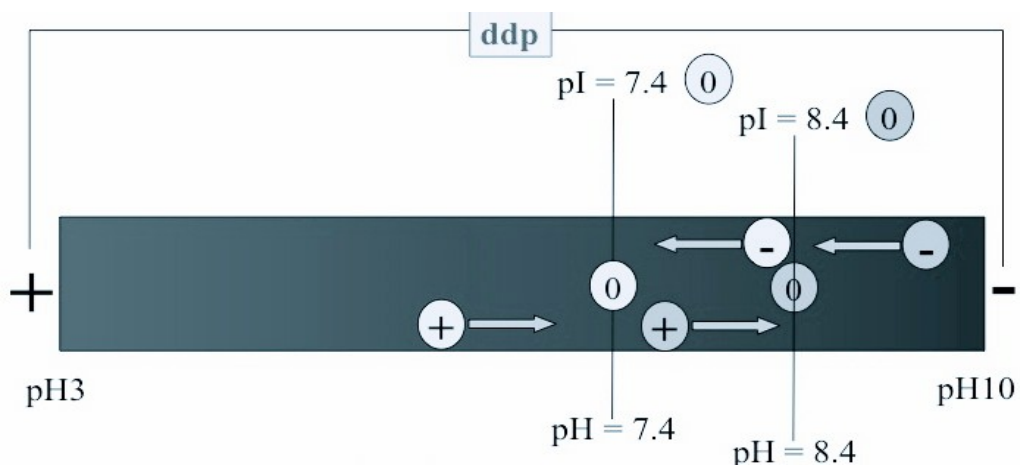


Figura 2. Schematizzazione del principio di migrazione proteica verso l'anodo o il catodo in IEF.

Questa tecnica elettroforetica viene quindi utilizzata per la separazione di proteine in miscele complesse sfruttando la capacità di discriminare tra punti isoelettrici che differiscono anche solo di 0,01 unità di pH (Westermeier et al, 2001). Attualmente il gradiente di pH è ottenuto mediante l'utilizzo delle immobiline, dei derivati dell'acrilammide a cui sono stati aggiunti differenti gruppi funzionali, che hanno

permesso l'ottenimento di molecole con pK ben distribuiti e compresi in un range da 1 a 12. Tali composti vengono co-polimerizzati nel gel determinando così un gradiente di pH immobilizzato che garantisce un'elevatissima stabilità nel tempo (Görg et al, 2000). Il pH del gradiente sarà in funzione della quantità di immobiline con determinati pK usati nella polimerizzazione del gel. Grazie a tali molecole si possono ottenere gradienti di pH lineari o estesi e i range di pH possono essere molto vari, dallo standard 3-10 a gradienti di pH molto ristretti che possono anche essere di una sola unità di pH. Nell'IEF con IPG, la carica superficiale di un composto anfotero cambia e diminuisce, in accordo con la sua curva di titolazione, muovendosi lungo i gradienti di pH fino a raggiungere una posizione di equilibrio stabile nel punto in cui il pH eguaglia il punto isoelettrico: essendo in quella regione la mobilità uguale a zero, la molecola si ferma, indipendentemente dall'applicazione di una corrente elettrica, poiché il gradiente preesiste al passaggio di corrente stesso, essendo stato creato al momento della polimerizzazione del gel (Fig. 3).

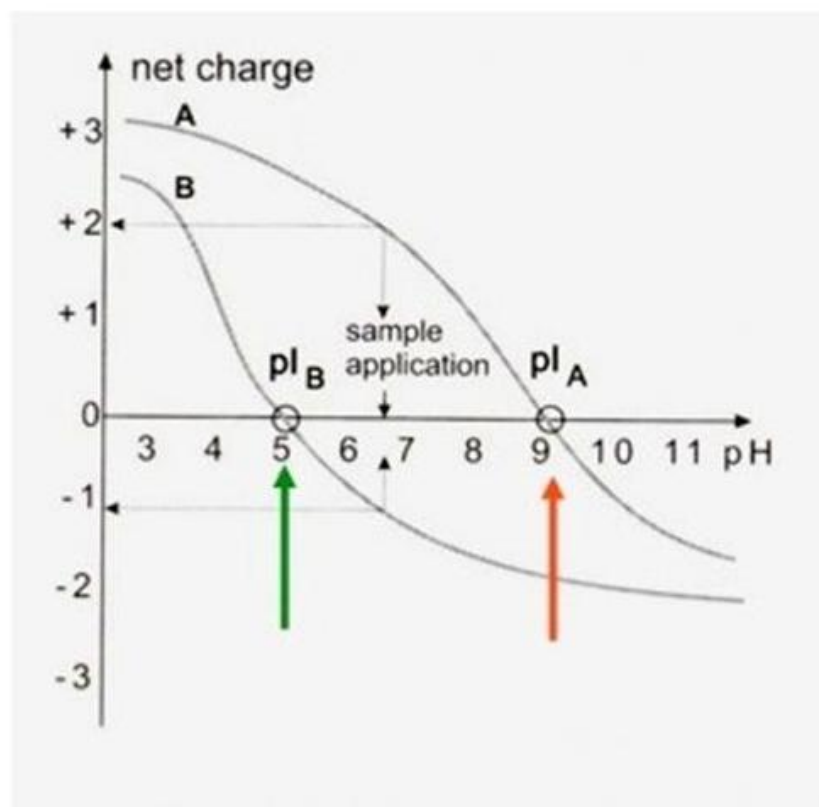


Figura 3. Schematizzazione dell'annullamento della carica netta di proteine con diverso punto isoelettrico.

Dunque il vantaggio dell'utilizzo delle IPG strip consiste nel fatto che il gradiente di pH è esistente prima della corsa elettroforetica, viene cioè copolimerizzato, e dunque

reso insolubile, entro le fibre della matrice stessa di poliacrilamide. Le IPG strip possono essere acquistate già pronte in commercio oppure realizzate in laboratorio. Dopo la polimerizzazione il gel col gradiente di pH immobilizzato dell'intervallo voluto viene tagliato in strisce, della larghezza di 3mm. In ogni caso le strip dovranno poi essere rigonfiate con agenti denaturanti, detergenti e riducenti (tipicamente urea 7-8M, tiourea 2M, CHAPS 2-4%, DTT 1-2%) per un periodo di tempo sufficientemente lungo (da 6 ore fino a overnight) (Fig. 4).

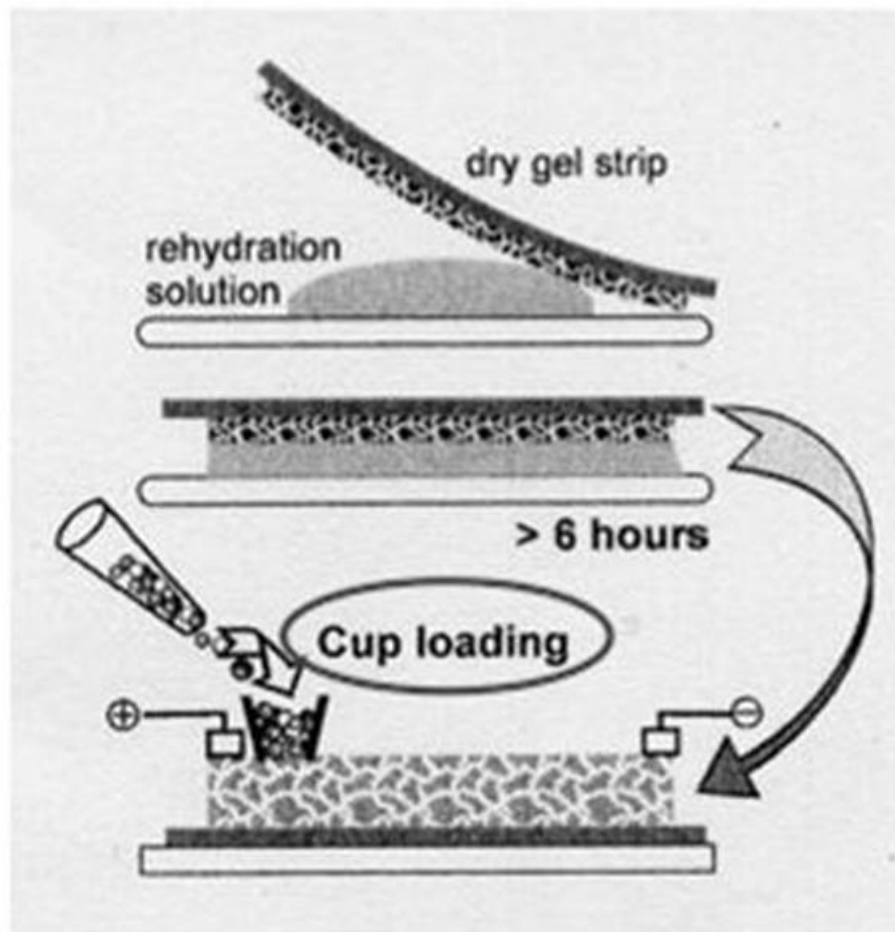


Figura 4. Schematizzazione della reidratazione delle IPG strip e del Cup loading (caricamento per IEF).

L'innovazione dell'introduzione delle immobiline ha dunque permesso di risolvere i problemi del focusing tradizionale, dove il pH costante, tamponato nel mezzo di separazione, conferiva alla superficie delle molecole una densità di carica, e dunque una mobilità, costante, che limitava la determinazione dell'esatto punto isoelettrico e la rivelazione finale. In più la sintesi di immobiline basiche ha permesso di coprire intervalli di pH più ampi e estremamente alcalini.

Seconda dimensione – SDS-PAGE

La seconda dimensione è la SDS-PAGE, un'elettroforesi su gel di poliacrilamide in presenza di sodio dodecil solfato (SDS) che discrimina tra proteine con differente massa molecolare. L'SDS è un detergente anionico che, una volta posto in soluzione acquosa, forma delle micelle che si legano con rapporto costante alle proteine mascherandone le loro cariche intrinseche in modo da conferire loro una carica netta negativa. La separazione elettroforetica avverrà quindi in base alla massa molecolare delle proteine, che tenderanno a migrare verso l'anodo (+) ostacolate da un effetto setaccio creato dalla struttura porosa del gel di poliacrilamide (Herbert, 1997). Difatti nella polimerizzazione (con acrilamide, bis-acrilamide, TEMED, APS, Fig. 5), variando la concentrazione di acrilamide (AA) si ottiene la variazione delle dimensioni dei pori.

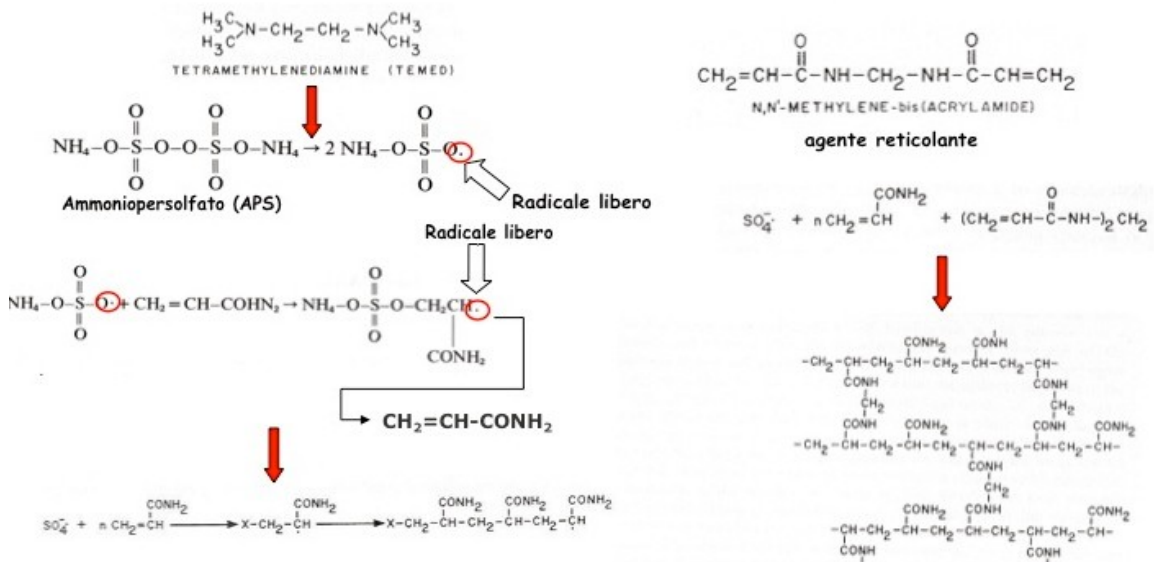


Figura 5. Rappresentazione schematica della reazione chimica che avviene nella polimerizzazione.

Aumentando la percentuale di acrilamide si otterranno dei pori di dimensione minore che quindi permetteranno una migliore risoluzione delle proteine a basso peso molecolare (Fig. 6).

Mediante l'utilizzo di "gradientatori" è possibile ottenere gel con un gradiente di concentrazione di acrilamide (AA), in modo da avere le dimensioni dei pori decrescenti dall'alto verso il basso. Le proteine migreranno in base al loro mW, in maniera più rapida e compiendo maggiori distanze se questo valore è basso, viceversa in modo più lento se è elevato.

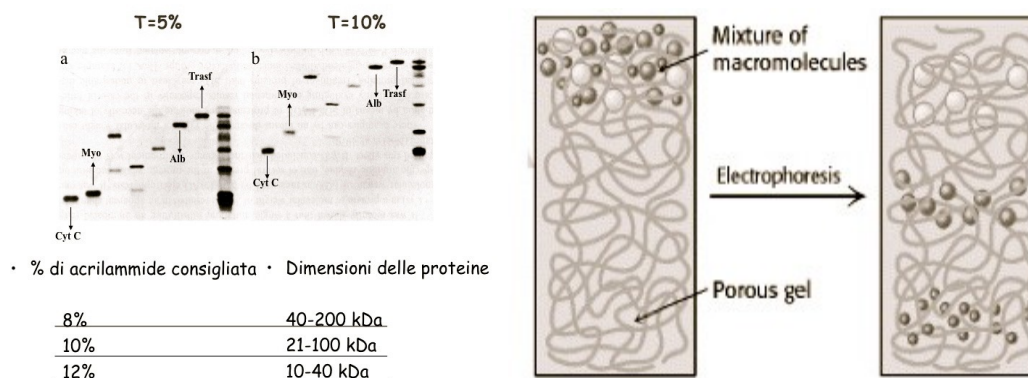


Figura 6. Percentuale di acrilamide consigliata (sinistra) nella polimerizzazione di gel SDS page a gradiente di porosità; schematizzazione della migrazione delle proteine con dimensioni diverse (destra).

Difatti la velocità di migrazione di una proteina in un campo elettrico (v) dipende dal valore del campo elettrico stesso (E), dalla carica netta totale della proteina (z) e da un coefficiente d'attrito che dipende dalla viscosità del mezzo di migrazione (f), secondo la legge fisica

$$v = \frac{Ez}{f}$$

Le IPG strip vengono poste nella parte alta del gel polimerizzato e mantenute in posizione tramite una soluzione riscaldata di agarosio allo 0,5% (mai superiore ai 60°C a causa dell'incompatibilità chimica con l'Urea), che garantisce anche la continuità fisica tra le IPG strip e il gel di poliacrilamide e l'assenza di bolle d'aria. Al lato della strip viene posizionato uno specifico marcatore per la corretta visualizzazione dei diversi pesi molecolari.

Le proteine, a questo punto già separate in base al loro punto isoelettrico, e aventi ora la medesima carica, corrono ortogonalmente rispetto al senso di corsa in prima dimensione.

Le condizioni di corsa vengono stabilite al fine di favorire in un primo step la migrazione delle proteine dalle IPG strip al gel SDS-PAGE con iniziale accumulo all'interfaccia, e, nel secondo step, la migrazione in base al mW, impostando valori fissi di amperaggio per gel fino a termine della corsa.

Colorazione del gel

La colorazione ha lo scopo di rendere visibili le proteine sul gel. Una tecnica di colorazione ottimale dovrebbe garantire una elevata sensibilità e linearità, essere

quantitativa, essere compatibile con analisi collaterali o consequenziali, ed essere il più possibile semplice ed economica. Una colorazione che possiede tutte queste caratteristiche non esiste, tutte presentano dei vantaggi e degli svantaggi. Attualmente le tecniche basate sulla fluorescenza sono in rapido sviluppo perché molto accurate a livello quantitativo, caratterizzate da un'elevata sensibilità, e sono compatibili con le metodiche di identificazione delle proteine e delle loro modificazioni post-traduzionali. Purtroppo presentano ancora degli svantaggi legati principalmente ai costi elevati e alla laboriosità della metodica.

Le colorazioni attualmente più utilizzate sono quelle organiche con Coomassie (R e G) e quella al nitrato d'argento. Le metodiche di colorazione basate sull'utilizzo del Coomassie sono stabili, riproducibili, veloci, quantitative e sono anche compatibili con l'analisi in MS. Lo svantaggio principale di queste tecniche è tuttavia la sensibilità, anche se dopo la messa a punto di colorazioni al Coomassie G colloidale si è ottenuto un notevole miglioramento in questi termini (Candiano et al, 2004). Lo stato colloidale è intermedio tra quello delle soluzioni liquide vere e proprie (caratterizzate da ioni e piccole molecole con diametro particellare compreso tra 0,001–0,1 μm , disciolte in un solvente) e quello di sospensioni sedimentabili. Il Coomassie G 250 è poco solubile nella soluzione di colorazione e dunque forma una soluzione colloidale, nella quale una piccola porzione di colorante si lega alle proteine passando in soluzione, finché, non legandosi più, ritorna in dispersione colloidale e infine precipita. Le tecniche di colorazione che utilizzano l'argento nitrato sono basate sulla saturazione del gel con gli ioni argento e sul legame tra questi ultimi e le proteine: la precipitazione di argento metallico determina la colorazione del gel. Questi metodi hanno limiti di rilevazione proteica molto bassi, arrivando a visualizzare anche un nanogrammo di proteina, ma non hanno un ampio range di linearità, il che non permette un loro uso per studi quantitativi. Per bloccare la reazione di rivelazione delle proteine è necessario utilizzare una soluzione di stop che prevede l'uso di sostanze in grado di chelare gli ioni argento. La durata della fase di rivelazione è pertanto arbitraria, quindi potrebbero esserci possibili problemi di riproducibilità.

Altro importante svantaggio nella colorazione con nitrato d'argento, come colorante, è l'incompatibilità con le analisi di spettrometria di massa (Jin et al, 2004). Tuttavia, la colorazione al nitrato d'argento rimane il metodo d'elezione, soprattutto nelle prove di standardizzazione dell'esperimento, in quanto possiede una sensibilità 10 volte maggiore rispetto alla colorazione Coomassie colloidale con coomassie brilliant blue (CBB) G-250 (Fig. 7) e di circa 100 volte maggiore rispetto a quella con coomassie CBB R-250. Specie se si lavora o ci si aspetta di lavorare con basse quantità di proteine nel campione da analizzare in IEF, il Silver Stain è il metodo di elezione.

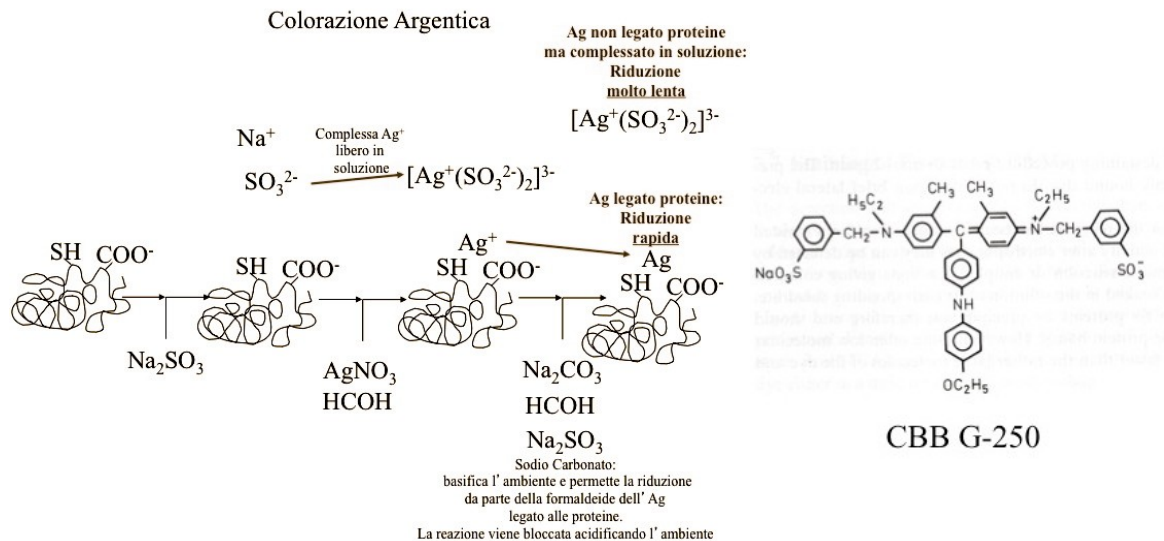


Figura 7. Rappresentazione schematica della reazione chimica alla base del Silver Stain (sinistra) e della formula chimica del Coomassie G Colloidale 250 (Westermeier et al, 2001, modificato).

Analisi di immagine

Le informazioni ottenute in un gel di elettroforesi bidimensionale sono elevate ed una loro corretta analisi prevede l'utilizzo di software dedicati all'analisi dell'immagine. Per questo le mappe bidimensionali vengono digitalizzate utilizzando appositi scanner densitometrici che garantiscono un'ottima risoluzione. Le immagini ottenute vengono quindi analizzate con software specifici per individuare differenze quantitative e qualitative tra gli spot. L'analisi di immagine si compone di vari passaggi di elaborazione che vengono effettuati sulle immagini. Tali passaggi prevedono l'individuazione degli spot (detection), un loro confronto fra gel differenti (matching), la quantificazione dei volumi, l'ottenimento di profili d'espressione e l'analisi statistica dei dati. Il principale problema dei software attualmente in commercio è nella loro non completa automatizzazione che permetta un'analisi più completa e precisa senza l'intervento manuale da parte dell'operatore. Il passaggio più critico è quello dell'identificazione degli spot (spot detection), dove è richiesto l'intervento dell'operatore per validare l'operato del software. E' infatti possibile che il software riconosca come spot un rumore di fondo o non riconosca come spot una proteina presente in bassa quantità. Dopo l'identificazione di uno spot vengono fornite a quest'ultimo una serie di caratteristiche quali area, volume, coordinate x/y ecc. Passaggio successivo è quello del confronto tra due o più mappe bidimensionali basato anche sulla creazione di gel virtuali di riferimento che contengono la totalità

degli spot rilevati in un determinato esperimento (Map Master). In tale passaggio i singoli spot vengono sovrapposti al gel di riferimento o con altri gel facenti parte dell'esperimento per valutarne il livello di espressione e la presenza in tutti i gel e quindi in tutti i campioni in esame.

Database di mappe bidimensionali

Come accennato, l'introduzione dei gradienti immobilizzati in prima dimensione ha permesso l'ottenimento di un elevato grado di riproducibilità nell'esecuzione di mappe bidimensionali anche tra laboratori differenti. Ciò ha permesso la costruzione di mappe elettroforetiche di riferimento caratteristiche di differenti tessuti, organi, cellule, microorganismi ecc (Map Master). Tali mappe possono essere inserite in banche dati specifiche che contengono anche iper-link degli spot identificati. Le informazioni presenti in queste banche dati non si limitano alle immagini dei gel ma contengono tutte le informazioni esistenti sulle proteine in questione. Attualmente i database sono sempre più specifici e informativi contenendo informazioni non solo sulla singola proteina, ma anche sulle modifiche post-traduzionali, sulla struttura e, quando note, sulle interazioni con altre proteine.

L'elevata riproducibilità ottenuta nell'esecuzione di gel bidimensionali permette il riconoscimento di spot basandosi sul confronto (matching) di una mappa con quelle già presenti in database o pubblicate da altri autori. Tale metodologia può permettere di ipotizzare la corrispondenza degli spot con proteine note anche se non è possibile effettuare analisi di spettrometria di massa. Tale metodo consente tuttavia solo un semplice riconoscimento di quegli spot proteici ben caratterizzati, ma è ovvio che non può essere utilizzato per riconoscere spot non ancora identificati.

2.1. LA PROTEOMICA NELLA VALUTAZIONE DEL SEME

Gli spermatozoi

Gli spermatozoi sono cellule uniche, sotto molti aspetti. Sono responsabili della trasmissione del patrimonio genetico paterno all'oocita, e vanno incontro a molte modificazioni cellulari, funzionali e cromatiniche nel corso della spermatogenesi che gli permettono di attraversare tutto l'apparato riproduttore, arrivare fino alla giunzione utero tubarica e penetrare all'interno dell'ovocita per depositarvi il proprio patrimonio genetico. Gli spermatogoni si dividono e danno origine agli spermatozoi primari, i

quali dopo una complessa ricombinazione genica danno luogo a spermatidi aploidi. Gli spermatidi vanno quindi incontro ad un processo di differenziazione cellulare chiamato spermiogenesi in cui subiscono marcati rimodellamenti cellulari e della cromatina. I nucleosomi vengono disassemblati e gli istoni rimossi e rimpiazzati da protamine, proteine con carica positiva che inducono un forte compattamento del DNA (Oliva et al, 2009), e permettono di minimizzare il volume del nucleo. A livello cellulare gran parte del citoplasma viene rimosso, e un ampio flagello e la vescicola acrosomiale, vengono assemblati allo spermatozoo. Infine tali cellule vanno incontro alla maturazione, processo che attraverso il transito nell'epididimo comporta la compattazione della cromatina mediante ponti disolfidi tra le protamine, e l'acquisizione di svariate funzioni cellulari e di membrana (Baker et al, 2005). Nelle vie genitali femminili gli spermatozoi andranno infine incontro alla capacitazione, un processo culminante con l'iperattivazione spermatica. Prima che lo spermatozoo penetri l'oocita, avviene infine il segnale di riconoscimento tra le due cellule, e la reazione acrosomiale. Una volta penetrato, il pronucleo maschile dello spermatozoo va incontro ad un ulteriore rimodellamento cromatinico, durante il quale le nucleoprotamine vengono disassemblate e si forma una nuova struttura nucleosomale e cromatinica (Oliva et al, 2009) (Fig. 8). La facile reperibilità del materiale seminale e l'importanza biologica dei processi riproduttivi ha favorito in passato una fioritura di studi sulla composizione, sui meccanismi di differenziazione e le funzioni di tali cellule. Recenti avanzate tecnologie, quali quelle proteomiche, hanno portato all'identificazione e allo studio funzionale di svariate proteine, nozioni prima altrimenti inaccessibili. Lo studio delle proteine contenute negli spermatozoi risale a molti anni prima dei primi studi di proteomica. Il pioniere in questo campo è ritenuto Friederich Miescher, che nel 1874 identificò nello sperma di salmone alcuni componenti proteici di basilare importanza, poi ribattezzate protamine, che apparivano accoppiate a quello che egli chiamò nucleine, e che in seguito è stato meglio conosciuto come DNA (Oliva et al, 2009). Si è iniziato a parlare di proteomica dello sperma nel 1997, e da allora, diversi studi sono stati condotti al fine di identificare il corredo proteico totale nelle specie di maggior rilievo scientifico (Aitken e Baker, 2008; Oliva et al, 2008, Aitken e Nixon, 2009; Gadella 2009; Oliva et al, 2009). Il vantaggio offerto dalla proteomica è quello di avere, in una sola separazione elettroforetica bidimensionale, un quadro completo delle proteine espresse in quel dato momento da un preciso comparto cellulare di un individuo. Da qualche anno in campo andrologico si sta concentrando l'attenzione sulla messa a punto di pannelli di SNP (modificazioni puntiformi di nucleotidi), per valutare l'associazione tra fenotipo e genotipo e mettere a punto dei test di valutazione del valore riproduttivo altamente "high throughput". Se da un lato però un approccio

mediante genomica funzionale può essere utile per creare database, pannelli di screening e metodi di analisi dell'espressione genica estensivi e relativamente rapidi, tuttavia non fornisce abbastanza informazioni a livello proteico, sia per quanto riguarda le isoforme prodotte da un dato gene, sia per quanto concerne le modificazioni post-traduzionali.

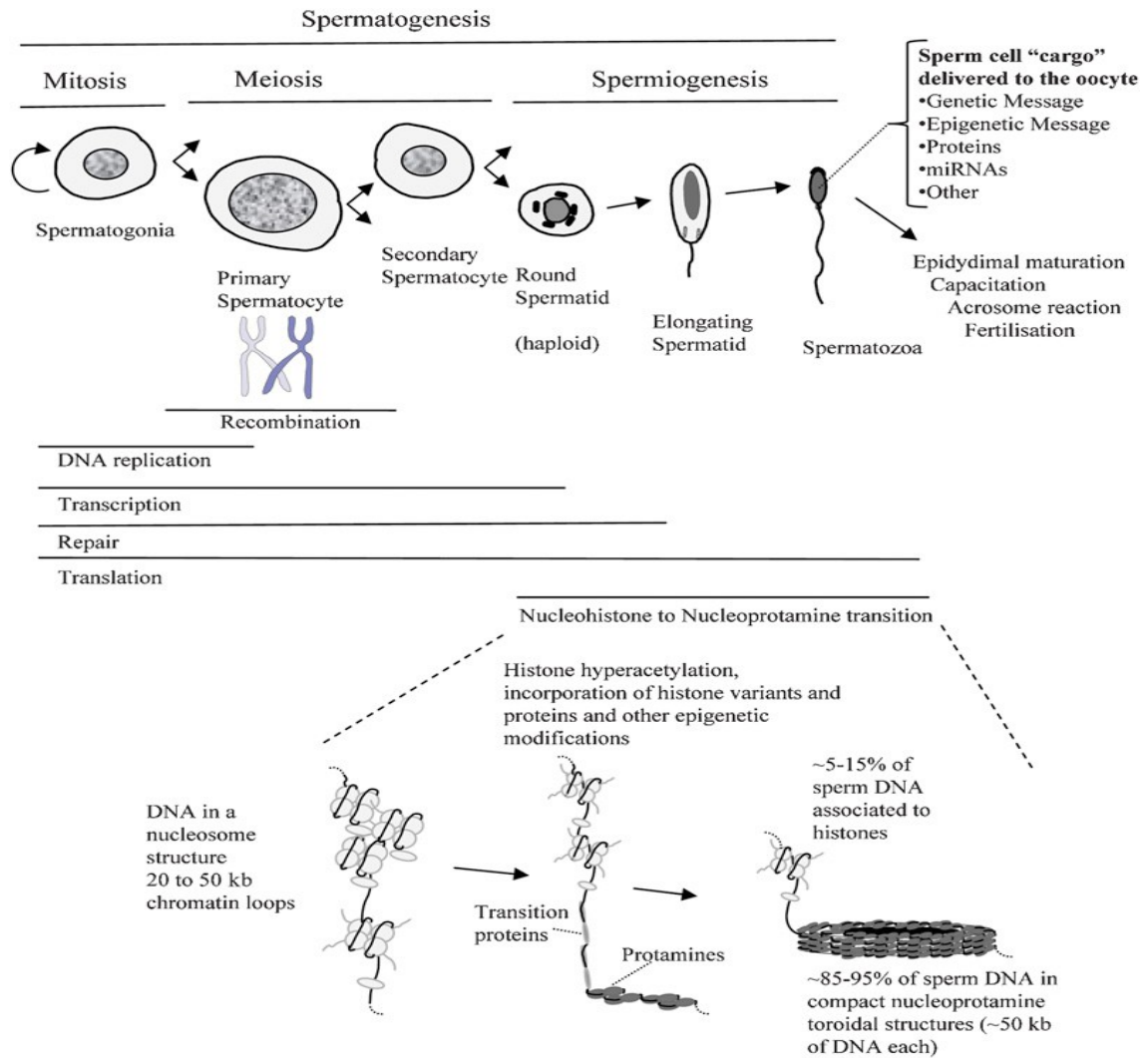


Figura 8. Rappresentazione schematica delle principali modificazioni genetiche e cromatiniche che si verificano nella spermatogenesi. La parte in alto rappresenta i cambiamenti cellulari che portano gli spermatogoni (sinistra) a divenire spermatozoi (destra). La parte in basso rappresenta i basilari cambiamenti cromatinici che avvengono di pari passo alla maturazione spermatica, e che implicano la transizione dei nucleoistoni in nucleoprotamine e il successivo impacchettamento del Dna nella tipica struttura toroidale. La ritenzione degli istoni associati al Dna è molto variabile in base alle specie. (da Oliva et al, 2009, modificato).

Difatti è ormai chiaro che il numero dei geni codificanti per le proteine nei mammiferi è sorprendentemente ridotto (circa 25000 nell'uomo) rispetto al numero delle proteine effettivamente presenti in un organismo (300000 o più), e ciò è dovuto a meccanismi di "alternative splicing" e modificazioni post-traduzionali (modificazioni lipidiche, glicosilazioni, fosforilazioni, proteolisi). Se la genomica, da una parte, può fornire ausilio nell'identificazione di modificazioni puntiformi di nucleotidi con effetto sui caratteri fenotipici, la proteomica comparativa può mettere in luce alcune modificazioni post-traduzionali del corredo proteico, anche in campo andrologico.

In andrologia la proteomica può assumere dunque un ruolo fondamentale, soprattutto in quanto gli spermatozoi sono "candidati ideali": si tratta di cellule altamente specializzate, che possiedono una ridotta quantità di organelli e citosol rispetto alle cellule somatiche; non possiedono il reticolo endoplasmatico, l'apparato del Golgi, i lisosomi, perossisomi e ribosomi, e dopo la maturazione i processi di trascrizione e traduzione vengono completamente silenziati. Presentano poi una membrana molto complessa e ricca in proteine, che subisce riarrangiamenti importanti durante la maturazione post-testicolare nell'epididimo e nelle vie genitali femminili. In più le proteine spermatiche sono responsabili, non solo delle funzioni cellulari stesse, ma anche dell'interazione con l'oocita.

Bisogna tuttavia sottolineare che, i metodi di estrazione proteica nello sperma sono estrapolati da quelli di altri tipi di tessuti, e tale approccio non specifico, potrebbe inficiare l'estrazione di proteine idrofobiche (come le proteine di membrana) o alcuni complessi proteici di grosse dimensioni. In tale contesto, individuare arbitrariamente dei marker di fertilità, risulterebbe un'impresa titanica. In considerazione di ciò, l'approccio proteomico più immediato e, probabilmente, più fruttuoso è quello comparativo.

L'utilizzo dell'elettroforesi monodimensionale (1-DE) in passato ha permesso l'accesso a notevoli informazioni concernenti la presenza delle maggiori proteine degli spermatozoi. Soltanto negli ultimi anni in medicina umana, grazie all'affinamento di tecnologie di elettroforesi bidimensionale (2-DE) è stato possibile identificare un numero sempre più elevato di proteine e chiarire alcuni punti oscuri riguardanti il loro funzionamento, interazioni e modificazioni. Studi condotti sull'uomo confermano la presenza di almeno 1000 spot proteici in campioni normospermici (Oliva et al, 2009). La conseguente escissione dai gel dei 145 spot più rilevanti e la successive analisi mediante tecnologia MS hanno condotto all'identificazione di 98 proteine diverse, e alla stima percentuale in base alla loro funzione biologica: produzione di energia (23%), implicazione in processi di trascrizione, sintesi di altre proteine, trasporto e turnover cellulare (23%), partecipazione al ciclo cellulare, ai meccanismi di apoptosi e

di reazione allo stress ossidativo (10%), ai segnali di traduzione (8%) o di riconoscimento cellulare (7%), al metabolismo (6%). Un 10% è rappresentato da componenti strutturali del citoscheletro e delle flagella, e dunque proteine fondamentali per l'esplicazione del movimento degli spermatozoi. Nel restante 11% la funzione non è ancora stata decifrata (Martinez-Heredia et al, 2006).

Il plasma seminale

Il plasma seminale dei mammiferi è un complesso fluido che serve come trasportatore degli spermatozoi nel loro tragitto dal testicolo fino al loro bersaglio, l'oocita maturo pronto per la fecondazione (Thomas et al, 2003).

Il plasma seminale è formato dalle secrezioni dei testicoli, dell'epididimo e delle ghiandole sessuali accessorie (prostata, ghiandole vescicolari, ampullari e bulbo uretrali) e contiene una vasta varietà di componenti biochimici, ioni organici, zuccheri, sali organici, lipidi, enzimi, prostaglandine, proteine e altri vari fattori, alcuni dei quali sono relativamente specifici per la regolazione delle funzioni spermatiche (Laflamme e Wolfner 2013; Maxwell et al, 2007). La composizione delle proteine del plasma seminale di mammifero varia tra le diverse specie e ha importanti effetti sulla funzionalità spermatica (Cross, 1993; Mortarino et al, 1998; Strzezek et al, 2002; Villemure et al, 2003). Alcune proteine hanno influenza sulla motilità spermatica (Henricks et al, 1998; Sánchez-Luengo et al, 2004), vitalità e fertilizzazione (Brandon, 1999). L'elettroforesi su gel di poliacrilamide, in presenza di SDS, indicava la presenza di una proteina maggiore, identificata come spermadesina. Altre 4 proteine erano identificate come membri della famiglia delle BSP e RSP proteins (Bergeron et al, 2005). Il legame di alcune proteine del plasma seminale con lo spermatozoo può indurre un allungamento dei tempi di capacitazione e la successiva reazione acrosomiale (Manjunath P and Thérien, 2002). Queste proteine sono state descritte come fattori decapacitanti e devono essere rimossi, modificati e mascherati prima che gli spermatozoi subiscano la reazione acrosomiale (Manjunath P and Thérien, 2002; Manjunath et al, 1993), un processo essenziale per la successiva fertilizzazione.

È noto che nelle zone temperate dell'emisfero Nord, l'efficienza riproduttiva è influenzata dalla stagionalità, influenzando tra le altre caratteristiche la produzione spermatica quantitativa e qualitativa (Perez et al, 1997) e la capacità di fertilizzazione degli spermatozoi crioconservati (Guérin et al, 1992). Sono state descritte le variazioni stagionali nel volume e nella concentrazione spermatica (Smith et al, 1997) così come anche l'influenza stagionale sulla concentrazione delle proteine totali nelle proteine del plasma seminale, con una statistica differenza tra la stagione riproduttiva e quella

non riproduttiva. L'analisi delle proteine spermatiche mediante SDS Page nell'ovino, rivela che, numerose bande proteiche con un peso molecolare di 20-70 kDa, trovate nelle proteine del plasma seminale di tutti gli arieti studiati durante la stagione riproduttiva, erano assenti nel plasma di alcuni arieti durante la stagione non riproduttiva. Inoltre, alcune proteine, erano presenti sia in stagione non riproduttiva, che riproduttiva, anche se una maggior concentrazione era presente nei campioni della stagione riproduttiva. È stato inoltre messo in evidenza come, alcune proteine del plasma seminale, possano riparare e prevenire il danneggiamento delle membrane da shock termici. Sono state evidenziate due proteine, di 14 e 20 kDa, che sembrerebbero essere responsabili di questo effetto protettivo (Barrios et al, 2005).

Comunque le funzioni dei vari componenti proteici nel plasma seminale non sono ancora chiare. Fattori di antifertilità nel plasma seminale sono stati descritti per numerose specie (Reyes et al, 1975; Reddy et al, 1982; Audhya et al, 1987; Eng e Oliphant, 1978; Shivaji et al, 1984). Questi fattori inibiscono la capacitazione spermatica, la reazione acrosomiale e l'attività di enzimi acrosomiali prima della fertilizzazione. Al contrario diversi fattori proteici sono stati descritti come promotori della vitalità spermatica e della fertilizzazione (Miller et al, 1990; Audhya et al, 1987; Aumuller et al, 1988; Sanz et al, 1993). L'elettroforesi delle proteine del plasma seminale potrebbe essere lo strumento per mappare e identificare proteine solubili, componenti dell'eiaculato, di diverse specie di mammifero (Autiero et al, 1991) e questo approccio ha permesso a diversi ricercatori di evidenziare alterazione nelle proteine di spermatozoi normali rispetto a quelli patologici.

3. STUDIO DELLA METABOLOMICA: ELETTROFORESI CAPILLARE

L'elettroforesi capillare (CE), che, conosciuta anche come Elettroforesi Capillare ad Alta Performance (HPCE), può essere fatta risalire ai primi anni '80, quando alcuni centri di ricerca statunitensi ed europei proposero l'ottimizzazione della tecnica elettroforetica tradizionale basata su gel, mediante l'applicazione di tecnologie strumentali evolute. E' a partire poi dai primi anni '90 che la CE ha iniziato ad essere introdotta nel campo delle applicazioni e da allora ha coinvolto numerosissimi ricercatori afferenti a discipline assai diverse, dalla biochimica alla genetica, dalla biomedicina alla chimica e dalla farmacologia alle biotecnologie. Sin dalle sue prime applicazioni, la CE, è stata impiegata per l'analisi di farmaci, assumendo importanza gradualmente crescente nell'ambito della ricerca farmaceutica, particolarmente nell'ambito dei biofarmaci. Da questo ambito, all'analisi di tossici e droghe illecite e dei loro metaboliti sia in preparazioni clandestine che in campioni biologici, il passo sembrerebbe breve, ma in

realtà ha richiesto vari decenni. In realtà, grazie alla sua versatilità, la CE, può venir applicata ad un ampio spettro di sostanze, da ioni inorganici a biopolimeri di notevoli dimensioni quali proteine, DNA e persino particelle virali. Inoltre, in CE, servendosi dello stesso hardware strumentale, è possibile eseguire separazioni basate su meccanismi chimico-fisici differenti (ad esempio il meccanismo elettroforetico e il cromatografico). Un'importante caratteristica della CE, oltre alla grande versatilità di applicazioni, riguarda l'elevata efficienza separativa (oltre un milione di piatti teorici), l'alta sensibilità (in termini di massa e, con specifiche procedure, anche di concentrazione), la richiesta di quantità di campione da caricare estremamente bassa (nL), tempi di analisi piuttosto brevi (in genere meno di 30 minuti), consumo minimo di solventi (pochi mL di buffer di corsa al giorno) e di altri consumabili (come i capillari), l'opportunità di accoppiamento con diversi sistemi di rivelazione, compresa la spettrometria di massa.

Principi separativi e strumentazione

Il termine "elettroforesi" indica un meccanismo di separazione molecolare basato sulla migrazione differenziale di molecole elettricamente cariche in un campo elettrico. Nell'elettroforesi "capillare", il potenziale è applicato appunto tra le due estremità di un capillare, del diametro di poche decine di micrometri, riempito di soluzione elettrolitica. Le cariche delle molecole derivano dai gruppi ionizzabili che le stesse contengono quando presenti in soluzione e che fanno di esse dei cationi (con carica positiva) o degli anioni (con carica negativa). La velocità di migrazione degli ioni in questione per effetto del campo elettrico varia in rapporto a due fattori:

- le forze di spinta generate dalla differenza di potenziale applicata;
- le forze frenanti tra ioni e mezzo circostante. Uno ione in soluzione è quindi soggetto a due componenti:

→ una forza di spinta (F_s) ovvero $F_s = q \cdot E$ In cui: q = carica elettrica della molecola o ione E = campo elettrico (potenziale/distanza di applicazione)

→ una forza frenante $F_f = 6\pi\eta r \cdot v$ In cui: $6\pi\eta r$ = legge di Stokes r = raggio della particella η = viscosità del mezzo v = velocità di migrazione elettroforetica

In condizioni di equilibrio, eguagliandosi la F_s alla F_f si ha che: $q \cdot E = 6\pi\eta r \cdot v$
 Ricavando v (velocità di migrazione) dall'equazione si ottiene: $v = q \cdot E / 6\pi\eta r$ da cui si deduce che la velocità di migrazione elettroforetica è direttamente proporzionale alla carica elettrica dello ione e al gradiente di potenziale, ma inversamente proporzionale al raggio r della molecola. Poiché, però, per una specifica corsa elettroforetica, le molecole sono immerse nello stesso mezzo, e su di esse viene applicato lo stesso

campo elettrico, alcuni dei parametri visti risultano costanti, ovvero $E, 6\pi\eta = K$ si evince che la velocità di migrazione delle specie ioniche dipende dal rapporto carica/raggio: $v = q/R$ Inoltre, dato che il raggio ionico di una molecola è correlato al suo peso molecolare, si dice, comunemente, che la migrazione dipende essenzialmente dal rapporto carica/massa.

La strumentazione

Un elettroferografo capillare è composto da un sistema di iniezione, da un capillare di silice di lunghezza e diametro variabili ($L= 20-100$ cm, $D= 20-100$ μm), da una sorgente di potenziale elettrico (10-30 kV) e da un "rivelatore". La separazione avviene all'interno del capillare successivamente alla fase di iniezione. I capillari maggiormente impiegati nella pratica moderna sono in silice fusa, rivestiti esternamente da un polimero opaco in grado di conferire resistenza e flessibilità al capillare. Tale materiale va rimosso in corrispondenza della finestra di rilevazione, al fine di permettere una corretta rivelazione degli analiti. Per quanto riguarda le caratteristiche interne dei capillari, questi si possono suddividere in "uncoated" (ovvero non rivestiti) che espongono la superficie interna di silice al buffer e ai soluti oppure in alternativa, "coated", ovvero rivestiti internamente da un sottile strato di polimeri (adsorbiti o legati chimicamente), che proteggono la silice dalle interazioni con i soluti, cambiandone le caratteristiche superficiali. I capillari possono anche essere riempiti con gel, in modo da simulare la gel elettroforesi, o con particelle contenenti una fase stazionaria, riproducendo così un sistema cromatografico. Le tecniche di iniezione prevalentemente utilizzate in CE sono due: l'idrodinamica e l'elettrocinetica. La prima è condotta applicando una pressione positiva all'estremità di iniezione del capillare (oppure una pressione negativa all'estremità opposta) mentre l'iniezione elettrocinetica si esegue applicando una differenza di potenziale tra la vial del campione e quella dell'estremità opposta del capillare (pochi kV per pochi secondi), realizzando così una specie di mini-elettroforesi. La principale differenza tra queste due modalità di iniezione consiste nel fatto che nell'iniezione idrodinamica (pressione-guidata) ciò che viene iniettato è rappresentativo della composizione del campione, mentre nell'iniezione elettrocinetica (potenziale-guidata) le sostanze presenti nel campione entrano nel capillare in base alla loro mobilità elettroforetica. Affinché nel sistema venga mantenuta una elevata efficienza di separazione, il volume di iniezione non deve superare poche decine di nL (1-2% del volume totale), dal momento che il volume totale del capillare è minimo (dell'ordine del μL). All'interno del capillare si verifica un fenomeno cruciale al fine della separazione elettroforetica, ovvero la

generazione di un flusso elettroosmotico (EOF). Esso si forma in presenza di tamponi di separazione a pH >2. In tali condizioni, la parete interna (in silice fusa) del capillare espone gruppi silanolici ionizzati negativamente (SiO⁻) in grado di interagire elettrostaticamente con gli ioni positivi presenti in soluzione. I cationi, essendo attratti dalle cariche negative dei gruppi silanolici, si concentrano all'interfaccia con la parete del capillare e al momento dell'applicazione di una differenza di potenziale, essi migrano verso il catodo (elettrodo negativo) richiamando acqua per osmosi. Tale fenomeno genera un flusso di liquido all'interno del capillare chiamato appunto flusso elettroosmotico (EOF). Una caratteristica di questo flusso è il suo profilo piatto (simile ad un pistone) in grado di limitare la diffusione delle bande di migrazione durante la separazione. Tale flusso, in alcune speciali applicazioni, è propriamente responsabile della separazione. In conseguenza della sua natura, l'EOF è fortemente influenzato dal pH, dalla composizione del tampone e dalla forza ionica. Al fine di eliminare o di invertire l'EOF, la parete interna del capillare può essere rivestita di "agenti modificanti" che possono essere adsorbiti fisicamente alla parete stessa. I rivestimenti più comunemente usati sono in poliacrilammide, cellulosa, aminoacidi, surfattanti, polivinilacetato (PVA), ammine, composti aril-pentafluorurati, polietileneimine, poli(vinilpirrolidone) ecc. L'elettroforesi capillare è stata accoppiata con successo a diverse modalità di rivelazione. La più comunemente impiegata con la moderna strumentazione è la rivelazione UV, la quale sfrutta la capacità dei vari composti di assorbire la radiazione luminosa. Per questo motivo, nella rivelazione "on-column", parte del rivestimento opaco viene rimosso in corrispondenza della finestra di rivelazione. Nel caso di analiti trasparenti alla radiazione luminosa, mediante l'aggiunta di un cromoforo al tampone di corsa, è possibile eseguire una rivelazione di tipo indiretto. In questo modo diventano rilevabili molti piccoli ioni inorganici, consentendo la loro determinazione in CE, anche senza un rivelatore specifico. Alla rivelazione UV si è recentemente affiancata la rivelazione con diode array (DAD) in grado di registrare anche lo spettro di assorbimento UV degli analiti. I limiti di sensibilità intrinseci alla CE (dovuti soprattutto alla minuscola quantità di campione iniettabile, dell'ordine dei nL) possono essere superati adottando tecniche di rivelazione più sensibili, ad esempio, la fluorescenza laser-indotta (sensibilità > 10⁻¹² M), la rivelazione elettrochimica (sensibilità > 10⁻⁸ M), oppure più recentemente la spettrometria di massa. Al medesimo scopo possono essere impiegati anche metodi di pre-concentrazione del campione, come il field amplified sample stacking (FASS) che assicura miglioramenti nella sensibilità di 2-3 ordini di grandezza. In realtà, i principali avanzamenti tecnologici ottenuti di recente in CE, coinvolgono l'accoppiamento con la spettrometria di massa tradizionale (MS) e ad alta risoluzione (HRMS). Questo è stato

possibile grazie soprattutto alla diffusione commerciale di interfacce robuste e affidabili (principalmente elettrospray). L'elettroforesi capillare è stata così accoppiata a rivelatori di massa a trappola ionica (ITMS), a singolo e triplo quadrupolo, a settore magnetico, a trasformata di Fourier e a tempo di volo (TOF-MS).

3.1. RILEVATORE A FLUORESCENZA LASER-INDOTTA

Si parla di "emissione" quando, da un corpo, proviene un flusso di energia sotto forma di suono od onde elettromagnetiche, oppure un flusso di materia sotto forma di elettroni o altre particelle. Quando viene emessa luce, si parla di "luminescenza".

La fluorescenza è un caso particolare di luminescenza che si verifica per "eccitazione", cioè sotto l'influenza di qualche altra radiazione elettromagnetica che colpisce il corpo luminescente: l'essenziale è che quel corpo possa emettere luce (anch'essa una radiazione elettromagnetica), quando è colpito da una radiazione di diversa lunghezza d'onda. La fluorescenza si distingue dunque dalla diffusione, nella quale non avviene un cambiamento della lunghezza d'onda (indicata con la lettera greca λ {"lambda"}). Se l'emissione avviene e cessa entro 10^{-8} s dopo l'eccitazione si parla di fluorescenza; se si mantiene per un tempo più lungo dopo il cessare dell'eccitazione, anche per molti minuti, si parla di "fosforescenza". La fosforescenza può durare così a lungo, poiché l'eccitazione può trasmettersi da un atomo all'altro per qualche tempo, in una specie di staffetta continua; quando tutta l'energia d'eccitazione è esaurita, la fluorescenza cessa. La fosforescenza raramente avviene nei gas: in essi, infatti, le distanze interatomiche sono abbastanza grandi perché l'eccitazione del singolo atomo avvenga senza coinvolgere quelli vicini. Nei solidi e nei liquidi, invece, l'interazione fra gli atomi è forte e le cose si complicano. La fluorescenza "da radiazione", eccitata cioè da altre radiazioni elettromagnetiche, può conseguire ad un irraggiamento nel campo infrarosso, ottico, ultravioletto, X, γ , ecc. Il fenomeno può coinvolgere singoli atomi o interi edifici molecolari, in solidi, liquidi, raramente nei gas. In particolare, nei gas rarefatti si presenta più spesso il fenomeno della "radiazione di risonanza". Questo è il meccanismo: un gas presenta uno spettro di assorbimento caratteristico costituito da una serie di righe definite, ognuna corrispondente ad un salto energetico possibile di qualcuno dei suoi elettroni. Se quel gas è colpito da una radiazione di frequenza tale che i fotoni di quella trasportino un'energia pari o superiore a quella di uno dei salti energetici dell'atomo, alcuni elettroni si possono eccitare e, entro 10^{-7} s, ritornano al livello energetico iniziale riemettendo radiazione della stessa lunghezza d'onda di quella d'eccitazione. Si ha qui un fenomeno di risonanza di elettroni, e la radiazione prodotta è appunto chiamata "di risonanza"; non si tratta di vera fluorescenza.

Quando invece gli atomi riemettono fotoni di energia inferiore a quella della radiazione eccitante, la radiazione emessa è di lunghezza d'onda maggiore. È questa la fluorescenza vera e propria, ed il fatto che la radiazione riemessa abbia lunghezza d'onda maggiore di quella d'eccitazione, è espresso come "legge di Stokes". Può avvenire a volte che gli atomi, nel ritornare allo stato di riposo dopo l'eccitazione, si scambino energia sufficiente a produrre fotoni più energetici di quelli assorbiti, per cui la radiazione di fluorescenza ha lunghezza d'onda minore di quella eccitante. Questa emissione in righe o bande spettrali che disobbediscono alla legge di Stokes si chiama "anti-Stokes". L'effetto Raman è un caso particolare di fluorescenza, e si verifica quando la radiazione che incide su un certo materiale non corrisponde a nessuna delle righe o bande di assorbimento degli atomi del materiale stesso. La radiazione emessa può obbedire o non alla legge di Stokes, ma è sempre assai debole. Si tratta di fenomeni di eccitazione-diseccitazione di stati "vibrazionali" delle molecole; essi sono assai più complessi di quelli atomici a causa delle interazioni esistenti fra gli atomi della stessa molecola. Questo significa che un'analisi spettrografica della radiazione Raman consente di riconoscere la composizione chimica di una sostanza, anche se associata ad altre in una miscela complessa. La spettrografia Raman sta, infatti, diventando una tecnica di analisi biochimica sicura e precisa. La fluorescenza si mette in evidenza irradiando (con la massima intensità possibile) un corpo con una o più lunghezze d'onda. Osservando lateralmente il corpo irradiato, si può rivelare la radiazione di fluorescenza. Dato però che quest'ultima è assai più debole della radiazione eccitante, occorre in genere proteggere ulteriormente l'occhio o il rivelatore dal fascio di eccitazione ed evitare che quest'ultimo possa nascondere la radiazione di fluorescenza. Ciò si fa sfruttando la legge di Stokes: si pone fra la sorgente ed il materiale fluorescente un filtro (del tipo "passa-alto") che ha la massima trasmissione per le radiazioni da un certo valore di lunghezza d'onda in giù; le lunghezze d'onda maggiori vengono arrestate da questo filtro, detto "di eccitazione". Sopra il limite superiore della banda di trasmissione di questo filtro si va a cercare la radiazione di fluorescenza osservandola attraverso un filtro ("di arresto" o "di sbarramento" {del tipo "passa-basso"}) che ha una curva di trasmissione complementare di quella del filtro d'eccitazione (fig. 9); esso cioè trasmette nel miglior modo la radiazione con lunghezza d'onda al di sopra della banda di eccitazione e sopprime al massimo le lunghezze d'onda contenute in quest'ultima. La radiazione di eccitazione è quindi eliminata e non disturba l'osservazione della fluorescenza, che è sempre infinitamente più debole. Per ogni fenomeno di fluorescenza è bene quindi disporre di un'opportuna coppia di filtri di eccitazione-sbarramento.

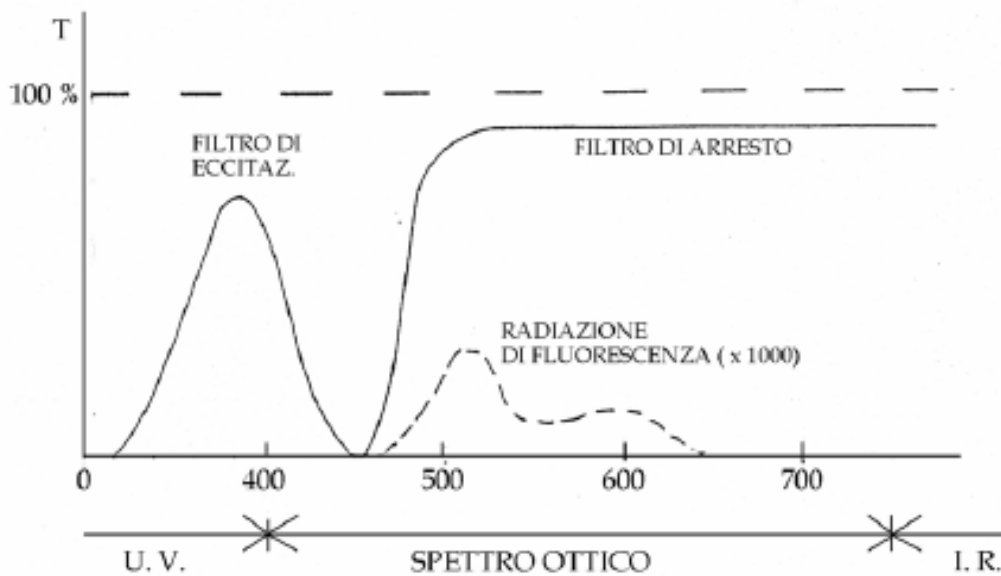


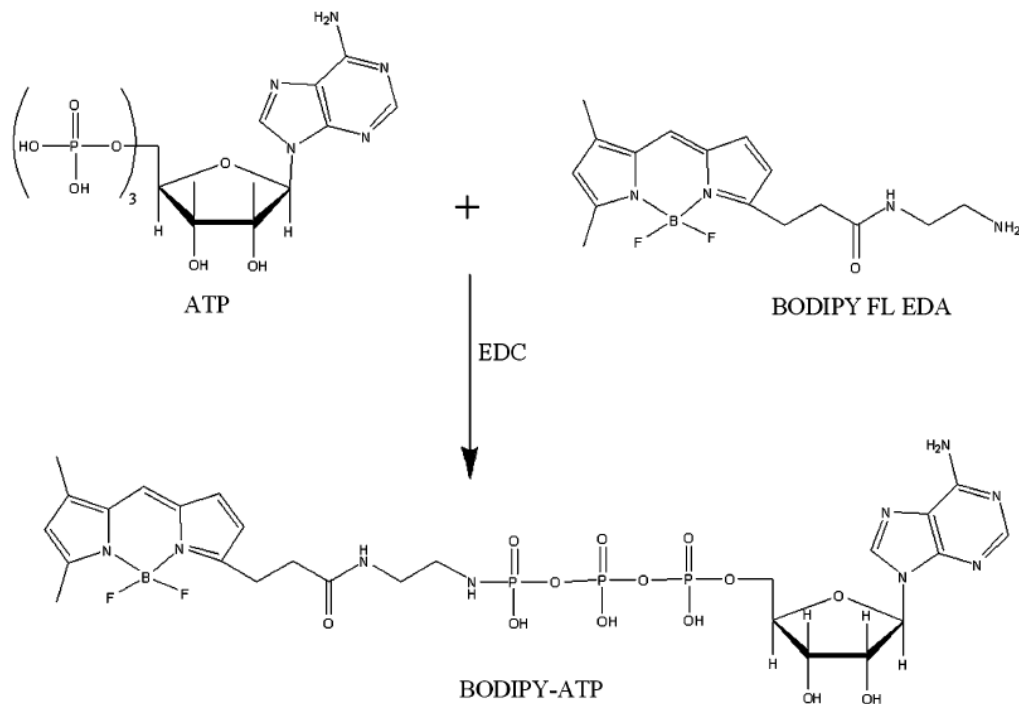
Figura 9. Curve di trasmissione di una coppia di filtri necessari per la comoda osservazione della fluorescenza. La curva in tratteggio è un possibile esempio di emissione di fluorescenza di un corpo.

D'altro canto, molti fenomeni di fluorescenza si svolgono con maggiore intensità illuminando l'oggetto con radiazione ultravioletta (UV). In questi casi, se la sorgente "di eccitazione" emette solo nel campo UV, la coppia di filtri citata non serve, poiché l'occhio umano non è sensibile alle radiazioni UV e può quindi percepire senza disturbo la radiazione di fluorescenza. Semmai, è prudente proteggere l'occhio con un filtro anti-UV. La fluorescenza è presente spontaneamente in certi minerali (fluorite, uraninite, ecc.), in certi petroli, in certi organi vegetali (tessuti contenenti clorofilla ed altri pigmenti, spore di funghi, soredi di licheni, ecc.); ed è questa la fluorescenza "primaria". Ma, specie in biologia, è spesso utile provocare la fluorescenza di un oggetto ("fluorescenza secondaria" o "indotta") trattandolo con opportune sostanze fluorescenti ("fluocromi"). Il vantaggio è che, per ragioni di affinità chimica o fisica, il fluocromo tende a legarsi selettivamente con certe parti dell'oggetto più che con altre, per es. su certi organuli cellulari. In questo modo il fluocromo si comporta come un colorante selettivo che aiuta a rivelare certe componenti chimiche e strutturali dell'oggetto. L'uso dei fluocromi si fa più interessante nella ricerca degli antigeni: si cerca di legare chimicamente un anticorpo con un fluocromo; poi si tratta coll'anticorpo fluorescente l'oggetto sospetto; se vi è un antigene (uno specifico antigene e solo quello), su di esso si concentra l'anticorpo rendendolo visibile a causa della fluorescenza. La reazione antigene-anticorpo è assai specifica e permette diagnosi veloci e sicure. L'uso di anticorpi fluorescenti è una tecnica di ricerca

diventata di routine in molte branche della medicina. Normalmente, questa tecnica si esercita a livello di cellule e tessuti; pertanto essa presuppone l'uso di un microscopio particolarmente attrezzato con l'aggiunta dei filtri di eccitazione e di sbarramento, di una sorgente adeguata, ecc. Per ragioni tecniche, si usa spesso in questi casi l'illuminazione "verticale" o "incidente" o "episcopica": l'oggetto non viene illuminato per trasparenza, ma "da sopra", cioè dallo stesso lato dell'osservazione.

In questo studio per valutare i livelli di ATP negli oociti è stata utilizzata l'elettroforesi capillare interfacciata con un sistema di analisi di massa e con un lettore di fluorescenza. La rivelazione delle molecole analizzate può essere effettuata mediante vari sistemi a seconda delle loro caratteristiche. Per molecole contenenti anelli aromatici la rivelazione può essere effettuata mediante un analizzatore a raggi ultravioletti che misura la radiazione liberata dagli anelli aromatici in seguito a eccitazione con raggi UV. Per molecole fluorescenti può essere utilizzato un sistema LIF di lettura della fluorescenza emessa in seguito a stimolazione laser a ben determinate lunghezze d'onda. La derivatizzazione di molecole non fluorescenti con apteni fluorescenti permette inoltre di analizzare anche molecole che non presentano fluorescenza intrinseca. Gli spettrometri di massa in serie al capillare permettono di valutare molecole di cui è noto il peso molecolare. Queste tre tecniche presentano differenti gradi di sensibilità, con le ultime due maggiormente sensibili rispetto alla lettura a raggi UV. L'utilizzo di lettori a fluorescenza è limitato a molecole derivatizzabili, nel senso della presenza di gruppi particolari che possono reagire chimicamente con gruppi reattivi dell'aptene fluorescente. La spettroscopia di massa è un sistema di rivelazione recentemente utilizzato anche in elettroforesi capillare che pertanto presenta ancora delle limitazioni dovute alla scarsa quantità di flusso e alla stabilità del segnale elettroforetico. È stata messa a punto la metodica per la determinazione dei livelli di molecole energetiche quali l'ATP intracellulare in relazione allo studio della valutazione dell'influenza delle tecnologie riproduttive sulla metabolomica dei gameti e dell'embrione preimpianto. È stata valutata la possibilità di analisi quantitativa dell'ATP mediante elettroforesi capillare e spettrometria di massa ma, nonostante l'elevata specificità, non veniva raggiunta una sensibilità elevata da quantificare questo nucleotide trifosfato, in un minima quantità di campione, quale quella presente nel poco volume di oociti o embrioni. Per migliorare quindi il limite di rivelazione è stato utilizzato un detector a fluorescenza laser indotta (LIF) che impiega un marcatore fluorescente, il 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionyl ethylene diamine hydrochloride (BODIPY FL EDA) come reagente derivatizzante. Questo marcatore si lega covalentemente con un legame amminico al gruppo fosfato di un deossinucleotide a sua volta attivato dalla carbodimmide. Si è

potuta sviluppare una metodica rapida e sensibile per la misurazione dei livelli di ATP in campioni poco concentrati come spermatozoi o oociti, impossibili da determinare con la rilevazione UV o spettrometria di massa. I campioni (spermatozoi od oociti) lisati vengono derivatizzati tramite aggiunta del BODIPY FL EDA e dell'EDC (la carbodimmide) come riassunto nello schema seguente, ed incubati per 24 ore a 25°C, prima di procedere con l'analisi in elettroforesi capillare munita di analizzatore LIF.



Un esempio del risultato è mostrato nella seguente figura 10.

3.2. RIVELATORE DI MASSA

La ionizzazione electrospray viene prodotta tramite l'applicazione di una intensa differenza di potenziale all'estremità di un capillare attraverso il quale si ha il flusso della soluzione contenente l'analita. La nebulizzazione ed il processo di evaporazione del solvente vengono coadiuvati da due flussi di gas inerte, solitamente azoto. Un flusso è coassiale al flusso dell'analita (chiamato nebulizer), l'altro invece è controcorrente rispetto al flusso dell'analita e riscaldato (chiamato drying gas). Attraverso tali flussi gli ioni si formano in soluzione e passano in fase gassosa grazie alla differenza di potenziale applicata.

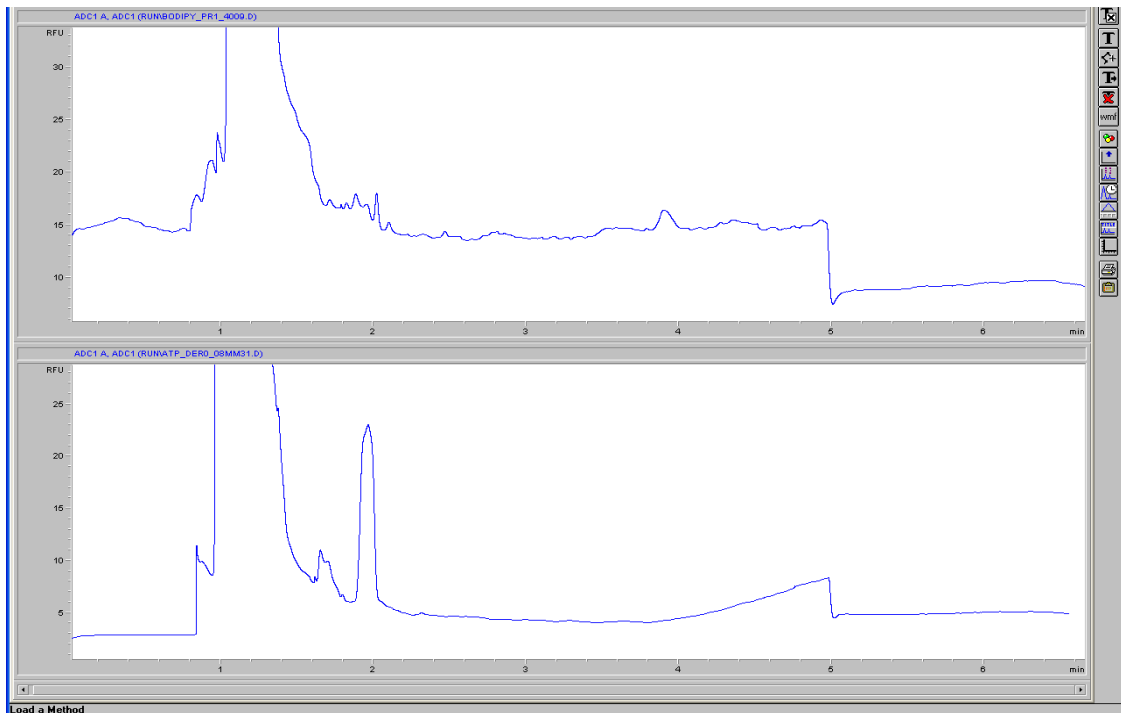


Figura 10. La figura rappresenta due elettroferogrammi di un controllo negativo e di un campione contenente una concentrazione di ATP 1 μ M del quale sono stati analizzati 15 μ L.

Analizzando in maniera più dettagliata il processo di ionizzazione electrospray sono state proposte due teorie differenti per la sua spiegazione. La differenza di potenziale applicata tra il capillare, all'interno del quale passa l'analita in soluzione, ed il controlettrodo, che si trova a qualche centimetro dalla sorgente, provoca la formazione di gocce di piccole dimensioni e cariche che all'estremità del capillare assumono la forma di un cono detto cono di Taylor (Fig. 11).

La sorgente è riscaldata ed al suo interno il solvente evapora dalle gocce formatesi facendone diminuire il diametro, e di conseguenza anche la loro superficie esterna, fino al momento in cui l'energia di repulsione coulombiana, dovuta alle cariche dello stesso segno, è uguale alla tensione superficiale. A questo punto si verificherà l'esplosione delle gocce, la quale provoca la formazione di gocce di dimensioni minori. La dimensione critica, definita come il momento in cui l'energia di repulsione coulombiana è pari alla tensione superficiale prende il nome di raggio di Rayleigh e l'equazione che lega la carica della goccia Q con il suo raggio R è $Q^2 = 64\pi^2\epsilon^0\gamma R^3$ dove:

Q = carica della goccia

γ = tensione superficiale del liquido

ϵ^0 = permittività nel vuoto

R = raggio della goccia

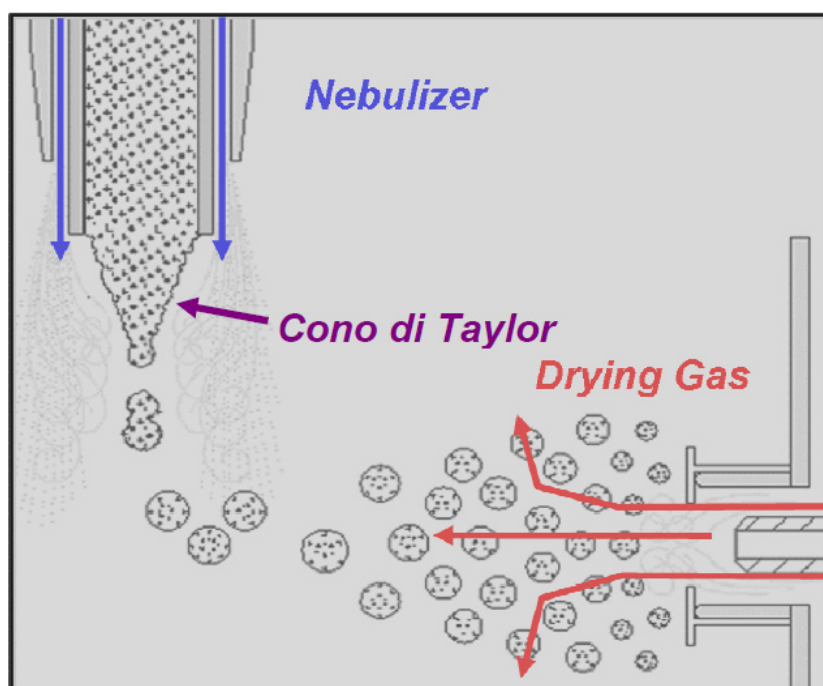


Figura 11. Schema di una sorgente di ionizzazione ESI.

Il passaggio che avviene in seguito, ovvero il passaggio dalla fase liquida a quella gassosa mediante una “esplosione” delle gocce cariche rimane ancora controversa e per la sua spiegazione sono state proposte due differenti teorie o modelli: il modello della carica residua o modello di Dole ed il modello dell’evaporazione degli ioni o modello di Iribarne e Thomson (Dole M,1968; Iribarne et al,1976). Secondo il modello di Dole la goccia madre, in seguito alle esplosioni coulombiane, genera gocce figlie che a loro volta vanno incontro allo stesso processo fino a quando non si arriva ad avere una singola molecola carica per goccia. Secondo il modello di Iridarne e Thomson invece, il passaggio degli ioni in fase gassosa avviene a partire dalle gocce figlie che hanno una densità di carica Q sufficientemente elevata, che corrisponde ad un determinato raggio R :

$$Q = 10^{-17} \text{ C}$$

$$R < 10 \text{ nm}$$

Gli ioni vengono emessi dalle gocce figlie in seguito all’evaporazione del solvente; durante il processo la densità di carica rimane costante e questo permette al fenomeno di ripetersi. Attualmente nessuno dei due modelli può essere considerato non corretto, anzi la teoria predominante è che il processo di ionizzazione electrospray avvenga secondo il modello di Dole per molecole di grandi dimensioni e secondo il modello di Iridarne e Thomson per le molecole di piccole dimensioni. Poiché le cariche

acquisite sono statisticamente distribuite tra i siti disponibili dell'analita, tale tecnica porta spesso alla formazione di ioni a cariche multiple di formula $[M+nH]^{n+}$ senza frammentazione; se la specie è policarica, dal punto di vista dello spettrometro di massa, si comporta come una specie "a massa più bassa" poiché nel rapporto massa/carica, quest'ultima non sarà più uguale a 1, ma può assumere valori differenti, a seconda della molecola che si sta analizzando. All'aumentare di z , il rapporto m/z diminuisce e quindi questo processo ha anche l'effetto di abbassare i valori di massa/carica fino a valori facilmente analizzabili da differenti tipi di analizzatori. Per quanto riguarda la ionizzazione electrospray, la quantità di corrente ionica che viene misurata dallo spettrometro è proporzionale alla concentrazione di analita. In presenza di basse concentrazioni di campione diventa cruciale una diminuzione del flusso per aumentare la sensibilità dell'analisi. Per rispondere a questa esigenza esistono due tipologie di sorgenti electrospray: la sorgente micro-electrospray e la sorgente nano-electrospray (Wilm M et al,1996; Wilm M et al,1996). Di particolare interesse è la sorgente nano-electrospray mediante la quale è possibile analizzare un campione utilizzando un flusso all'interno della sorgente di 50-500 nl/min. In questo tipo di sorgente il capillare metallico della sorgente electrospray è sostituito da un capillare in silice fusa avente un diametro interno di 10-15 μm ; il capillare è rivestito esternamente da un sottile strato metallico in modo che possa condurre corrente. La peculiarità di questo tipo di sorgente è rappresentata dalla ridotte dimensioni delle gocce di analita che si vengono a formare. Tali gocce hanno una densità di carica superiore ed un rapporto superficie/volume maggiore, i quali permettono un desorbimento degli ioni più veloce se confrontato con la sorgente electrospray. Un'altra caratteristica della sorgente, anch'essa dovuta alle ridotte dimensioni delle gocce, è che non necessita dell'utilizzo dei gas di solvatazione, inoltre la distanza fra il capillare ed il controlettrodo è minore e variabile e la differenza di potenziale applicata è minore, circa 1000 V, in modo da evitare scariche a corona all'interno della sorgente. Tipicamente, in strumenti con questo tipo di sorgente ionica, fra la sorgente e l'analizzatore di massa vi è una zona che costituisce l'interfaccia; questa assicura la transizione e la focalizzazione degli ioni nel passaggio dalla sorgente, che lavora a pressione atmosferica, e l'analizzatore di massa che si trova invece sotto alto vuoto. Nella prima parte dell'interfaccia generalmente vi è un capillare di vetro avente le estremità ricoperte da un materiale conduttore. A tali estremità è applicata una differenza di potenziale tale da favorire l'attraversamento del capillare da parte degli ioni. Per la focalizzazione del fascio di ioni vengono utilizzate delle lenti elettrostatiche, le quali generano una differenza di potenziale. Gli ioni vengono così trasportati all'analizzatore sotto l'effetto dei gradienti di pressione e potenziale. Al processo di focalizzazione degli ioni contribuiscono

fortemente anche altri elementi come ad esempio esapoli od ottapoli, ovvero delle barre metalliche alle quali è applicato un potenziale in radiofrequenza che permette la focalizzazione del fascio di ioni al centro delle barre e trasmettono un fascio di ioni monocinetico verso l'analizzatore. Inoltre nell'interfaccia si trovano anche degli skimmer, che hanno il ruolo di facilitare la definitiva eliminazione dei solventi che possono essere presenti all'interno dello strumento in forma gassosa (Fig. 12).

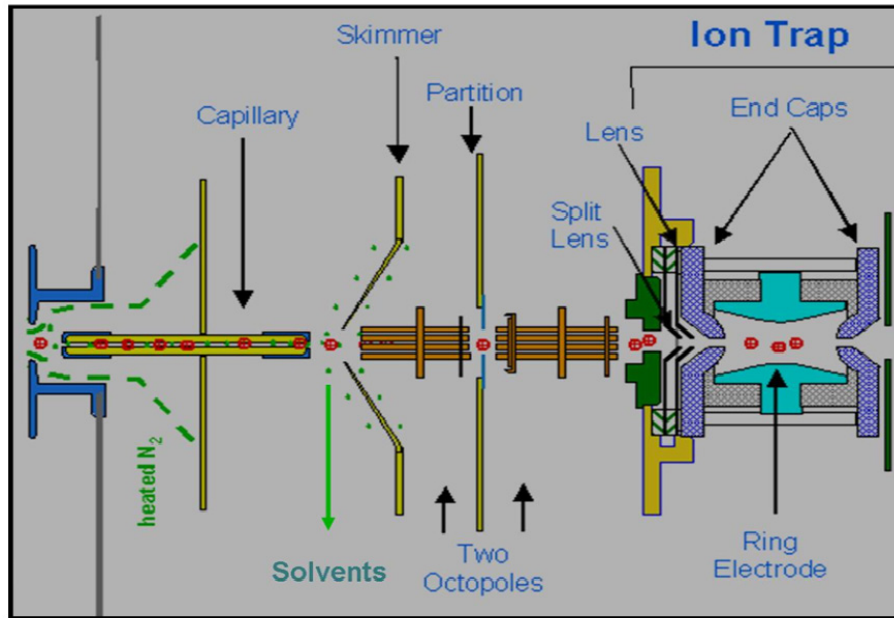


Figura 12. Esempio di schema di interfaccia per ESI-IT.

La differenza di potenziale generata fra la sorgente ed i componenti dell'interfaccia accelera gli ioni che così accumulano anche energia interna. In funzione dell'accelerazione e dell'energia interna acquisita, tali ioni possono frammentarsi in seguito alla collisione con molecole di gas residue all'interno dello strumento. Sfruttando questa peculiarità è possibile favorire o meno questa frammentazione aumentando o diminuendo l'energia con la quale si convogliano gli ioni verso l'analizzatore. Diminuendo la tensione di accelerazione diventa possibile lo studio di grandi complessi non covalenti, come ad esempio complessi proteici, mediante ionizzazione electrospray. Un analizzatore di massa spesso utilizzato in strumenti con sorgente ionica electrospray è la trappola ionica. Tale analizzatore differisce dalla maggior parte dei comuni analizzatori per il fatto che gli ioni non lo attraversano, ma vengono confinati ed accumulati al suo interno prima di essere inviati al rivelatore in seguito ad una loro scansione. La trappola ionica è costituita da due elettrodi semisferici, detti elettrodi a calotta, ai quali viene applicato un potenziale superficiale, ed un elettrodo ad anello al quale viene applicato un voltaggio a radiofrequenza. La trappola ionica si può immaginare come un cilindro avente il volume di circa 1 cm^3 ; gli

ioni entrano ed escono dalla trappola attraverso dei fori presenti sugli elettrodi a calotta. All'interno della trappola è presente elio il quale svolge il ruolo di "raffreddare" gli ioni, ovvero ne riduce l'energia cinetica in modo che questi, sotto l'effetto del campo elettrico, rimangano all'interno della trappola seguendo orbite stabili fino al momento in cui una data radiofrequenza non causi una destabilizzazione di tale orbita, la quale porta gli ioni a fuoriuscire dalla trappola ed andare al rivelatore. Per stabilizzare e destabilizzare le orbite degli ioni all'interno della trappola viene utilizzato un campo elettrico generato da corrente alternata. La trappola ionica presenta un'altra peculiarità: in essa possono avvenire i processi di isolamento degli ioni precursore e la loro frammentazione. Gli ioni frammento generati vengono in seguito trattenuti all'interno della trappola ed inviati al rivelatore seguendo lo stesso procedimento riportato in precedenza. Poiché è possibile eseguire l'isolamento e la frammentazione degli ioni all'interno di uno stesso spazio, in teoria, non vi è limite al numero di esperimenti MS/MS che possono essere effettuati fino al momento in cui non viene superato il limite di sensibilità dello strumento. La trappola ionica può essere paragonata, per il suo funzionamento, ad un analizzatore a quadrupolo che operi solamente in modalità di radiofrequenza; il potenziale applicato agli elettrodi comporta una sola componente sinusoidale: $\varphi_0 = \cos \omega t$. Le traiettorie che gli ioni compiono all'interno della trappola sono descritte dalle equazioni differenziali di Mathieu, in cui le soluzioni instabili corrispondono agli ioni espulsi dalla trappola e le soluzioni stabili agli ioni trattenuti invece al suo interno. Per quanto riguarda invece il processo di frammentazione degli ioni precursore, questo è provocato dalla regolazione della frequenza della corrente alternata sull'elettrodo a calotta di uscita degli ioni in modo che coincida con la frequenza di risonanza degli ioni precursore; così facendo gli ioni precursore entrano in collisione con le molecole di elio presente all'interno della trappola che svolge anche il ruolo di gas di collisione.

4. SCOPO GENERALE

Scopo generale di questa tesi è di utilizzare nuove metodologie per l'analisi proteomica e la valutazione metabolomica di substrati organici di importanza fisiologica e diagnostica per la valutazione di parametri di qualità di gameti maschili e femminili utilizzando come modelli la specie ovina ed equina. In particolare sono stati valutati:

- 1) Il metaboloma del plasma seminale di arieti ipofertili sottoposti a trattamento terapeutico con melatonina mediante elettroforesi capillare e spettrometria di massa;
- 2) Le caratteristiche energetiche in relazione alla qualità degli spermatozoi in stalloni di differente età mediante elettroforesi capillare e rilevamento spettrofotometrica in ultravioletto;
- 3) Concentrazioni di ATP e proteoma nel plasma seminale di stalloni ipofertili mediante elettroforesi capillare con rilevamento spettrofotometrico in ultravioletto ed elettroforesi bidimensionale;
- 4) Fattori metabolomici e proteomici correlati alla competenza allo sviluppo dell'ocita di ovino utilizzando l'elettroforesi capillare con rilevatore di fluorescenza laser indotta.

5. ESPERIMENTO 1: VALUTAZIONE DEL METABOLOMA DEL PLASMA SEMINALE IN ARIETI IPOFERTILI TRATTATI CON MELATONINA

Lo stress ossidativo è considerato una potenziale causa di infertilità in quanto, da studi condotti prevalentemente sull'uomo in associazione con l'ipofertilità è stato misurato un incremento delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'eiaculato. In condizioni fisiologiche, si ha un equilibrio ben controllato tra la produzione di ROS e le attività antiossidante nel tratto riproduttivo maschile. Ogni alterazione di questo equilibrio può portare a un danneggiamento di macromolecole e all'annullamento della loro funzione: induzione della per ossidazione lipidica, modificazione della sequenza primaria delle proteine e danneggiamento del DNA (Wang et al, 2003; Agarwal et al., 2008; Makker et al., 2009). D'altra parte, gli spermatozoi producono una piccola quantità di ROS nella catena respiratoria, che sono fisiologicamente essenziali per la motilità spermatica, l'iperattivazione, la capacitazione, la reazione acrosomiale, la fertilizzazione e la fusione con l'oocita (Agarwal et al, 2004, 2008; Saalu 2010). Rimane tuttavia da chiarire il meccanismo dell'azione dei ROS nella determinazione della fisiologica o anormale funzione spermatica che porta alla infertilità maschile (Saalu 2010).

Il plasma seminale contiene una vasta batteria di sostanze antiossidanti, indotte da condizioni di stress ossidativo per la neutralizzazione di quantità elevate di ROS. Uno dei fattori noti per la detossificazione dei radicali liberi e con attività antiossidante a largo spettro è la melatonina, una indolamina sintetizzata dalla ghiandola pineale (Poeggeler et al, 1994). Il ruolo fisiologico meglio conosciuto di questa molecola è quello di codificare il ciclo notte-giorno, ma ha anche altri ruoli correlabili alla crescita, allo sviluppo e all'invecchiamento cellulare di cellule e organi (Bauer et al, 2013; Reiter et al, 2013). Può inoltre attraversare facilmente le membrane e proteggere macromolecole intracellulari e DNA agendo direttamente su radicali dell'ossigeno e specie reattive dell'azoto, quali i radicali OH^* , O_2^* , NO^* e H_2O_2 . (Poeggeler et al, 1994; Hardeland, 2013). La sua attività si esplica anche stimolando l'espressione e la funzione di enzimi ad attività antiossidante (Reiter et al, 2009, 2013). Questa potente azione antiossidante della melatonina può avere implicazione per l'ottimale funzione di cellule e organi nel sistema riproduttivo maschile e femminile e può proteggere gli spermatozoi dal danneggiamento ossidativo (Reiter et al, 2009, 2013). È stato descritto che il trattamento con melatonina preserva gli spermatozoi e le cellule testicolari dopo vari tipi di stress ossidativo (Semercioz et al, 2003; Sarabia et al., 2009; Ji et al., 2012) e può essere utilizzata come agente farmacologico per proteggere contro danni

testicolari da stress ossidativo (Ji et al., 2012); in questa direzione è stato evidenziato un effetto positivo del trattamento con la melatonina su spermatozoi di varie specie in termini di vitalità, motilità e capacità di penetrare la zona pellucida alla fertilizzazione (Fujinoki, 2008; Reiter et al., 2013). È stato recentemente evidenziato anche un effetto sinergico con altri antiossidanti che potenzia l'azione di ciascuno di essi (Hardeland et al., 2013)

Nell'ariete è stato evidenziato come un incremento dei livelli ematici di melatonina induca un aumento dei livelli di testosterone nel sangue (Kennaway et al., 1985; Lincoln et al., 1981; Chemineau et al., 1992). L'incremento del valore medio del testosterone nel sangue di ariete, dopo somministrazione di melatonina, è stato attribuito all'effetto di questo ormone sull'ipotalamo (Malpoux et al., 1993; Arendt, 2005) o sull'ipofisi con incremento, in entrambi i casi, della secrezione dell'ormone luteinizzante (De Reviere et al., 1989; Chemineau et al., 1992; Arendt, 2005). Recettori per la melatonina sono infatti presenti nella zona dell'ipotalamo e dell'adenipofisi (Morgan et al., 1994; Arendt, 2005).

Sono stati riscontrati, inoltre, recettori per questo ormone nelle cellule del Leydig indicando che la melatonina potrebbe avere anche un effetto diretto sul testicolo (Shiu et al., 1996). Così come sono stati rilevati dei recettori nell'epididimo di ratto (Li et al., 1998) e nello spermatozoo umano (van Vuuren et al., 1992) suggerendo la possibilità che l'ormone pineale possa influenzare la motilità spermatica e il transito degli spermatozoi attraverso l'epididimo.

È stato inoltre evidenziato che la melatonina è in grado di indurre un incremento dell'attività dell'acrosina nello spermatozoo di ariete (Kokolis et al., 2000). L'acrosina si presume sia coinvolta nel riconoscimento e nel legame dello spermatozoo alla zona pellucida dell'oocita e alla penetrazione dello spermatozoo stesso attraverso la zona pellucida (Liu et al., 1993). Oltre a ciò, questo enzima risulta coinvolto nella capacitazione, nella reazione acrosomiale e nella decondensazione della cromatina durante la formazione del pronucleo maschile (Nuzzo et al., 1990). Questo potrebbe suggerire un possibile ruolo di questo ormone anche nella capacità fecondante della cellula spermatica.

Per il controllo dell'attività sessuale nella fase non riproduttiva, la somministrazione di melatonina associata ad impulsi di luce durante la notte, risulta molto efficace e viene utilizzata per indurre più precocemente l'avvento della pubertà. Infatti, in giovani arieti sottoposti a tali trattamenti, si osserva un incremento della produzione spermatica permettendo a questi animali di poter essere sottoposti anticipatamente ai test di progenie, utilizzando l'inseminazione artificiale (AI) (Chemineau et al., 1992).

Il trattamento negli arieti con impianti di melatonina a lento rilascio durante la stagione non riproduttiva porta ad una crescita dei diametri scrotali ed un miglioramento delle performance riproduttive nelle pecore in monta naturale (Palacin et al, 2008) o inseminate durante l'epoca non riproduttiva con seme proveniente da maschi con impianti di melatonina (Casao et al, 2010). È stato recentemente dimostrato che la melatonina svolge delle azioni benefiche a livello di motilità spermatica e in altre caratteristiche del seme di ariete durante la stagione non riproduttiva, con una diminuzione dell'indice apoptotico e nella capacitazione (Casao et al, 2010).

5.1. SCOPO

Lo scopo di questo studio era quello di valutare il metaboloma del plasma seminale di arieti ipofertili in seguito al trattamento farmacologico con melatonina, utilizzando l'elettroforesi capillare munita di rivelatore di massa, alla ricerca di marcatori molecolari modificati dal trattamento con la melatonina.

5.2. MATERIALI E METODI

Per il nostro esperimento sono stati usati un gruppo di otto arieti di razza sarda allevati presso AGRIS (Agenzia della Regione Sardegna per la ricerca scientifica, la sperimentazione e l'innovazione tecnologica nei settori agricolo, agroindustriale e forestale) loc. Bonassai S.S, 291 Sassari-Fertilia- Km 18,600, Sassari (40° latitudine nord e 8°longitudine) con un'età compresa tra i due e i quattro anni ed un peso dai 38-45 kg. Gli animali sono allevati in stabulazione permanente, con una razione alimentare costituita da fieno di prato stabile ed un'integrazione di 300 gr di un concentrato commerciale. Gli animali erano considerati ipofertili in relazione alle performances riproduttive al di sotto della media, come valutato dai tecnici della struttura.

In un esperimento preliminare si è proceduto a valutazione della qualità dell'eiaculato in maniera da poterne valutare le caratteristiche fisiologiche e funzionali e determinare l'eventuale alterazione della funzionalità spermatica. Dagli otto soggetti di razza sarda è stato prelevato il seme mediante l'utilizzo della vagina artificiale e ne è stata determinata la vitalità e la motilità per confronto con tre arieti di provata fertilità presenti nel nostro stabulario, utilizzati per il prelievo routinario del seme durante le attività del laboratorio.

Vitalità spermatica

La vitalità spermatica è stata determinata tramite l'utilizzo del colorante eosina-nigrosina (Pintado et al, 2000). Questa procedura si basa sul grado di permeabilità di membrana degli spermatozoi morti nei quali la testa assume una colorazione rosa (eosina), mentre la bassa permeabilità degli spermatozoi vivi esclude l'eosina e perciò si mantiene la colorazione biancastra della testa. La presenza della nigrosina assicura un adeguato contrasto del preparato (Chalah e Brilland, 1998). 10 µl di campione venivano miscelati per 2 minuti a temperatura ambiente con 500 µl di colorante; il vetrino veniva quindi esaminato con un microscopio Diaphon (Nikon) contando almeno 200 cellule per campione.

Motilità spermatica

Per la valutazione della mobilità dell'eiaculato fresco è stato utilizzato il Computer Assisted Sperm Analysis (C.A.S.A.), cioè un sistema video micrografico automatizzato e computerizzato che, sfruttando un software di elaborazione delle immagini, trasforma una visione microscopica in immagine digitalizzata, quindi analizzabile al computer.

Per effettuare l'analisi, una aliquota di seme fresco veniva diluita per ottenere una concentrazione di 25×10^6 spermatozoi/ml con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) e messa in una eppendorf ad incubare a 39°C per 5 minuti. Dieci microlitri di campione venivano quindi posizionati in una camera di Makler su un tavolino riscaldato a 38°C e la motilità spermatica analizzata con il C.A.S.A. (v 3.2.0 Microptics S.L., Barcellona, Spagna). Venivano analizzati da 3 a 5 campi (200 spermatozoi per campo) per campione.

Il grafico 1 mette in evidenza una differenza statisticamente significativa sia nella vitalità che nella motilità degli spermatozoi degli individui ipofertili rispetto a quelli controllo confermando l'ipofertilità dei soggetti.

4 arieti sono stati sottoposti a trattamento con melatonina nel mese di marzo mediante l'inserzione di tre impianti sottocutanei di 18mg l'uno, retro auricolari, di melatonina a lento rilascio (Melovine, Ceva Salute Animale) mentre gli altri 4 arieti sono stati utilizzati come controllo senza subire alcun trattamento. È stato effettuato un prelievo di seme al momento dell'impianto ed a distanza di 30 gg, 90gg e 120 gg. Gli eiaculati sono stati centrifugati a 10000 rpm per 10 min in una centrifuga Microfuge (Eppendorf) e il plasma seminale è stato prelevato e congelato a -80°C. Sui campioni di plasma seminale è stata effettuata la valutazione elettroforetica di metaboliti legati

alla qualità del seme Per l'estrazione dei metaboliti dal plasma seminale si è utilizzata la metodica di Capiello et al. 1993, che prevede una precipitazione acida delle proteine, si è deciso, quindi, di fare un pool dei soggetti trattati e non trattati.

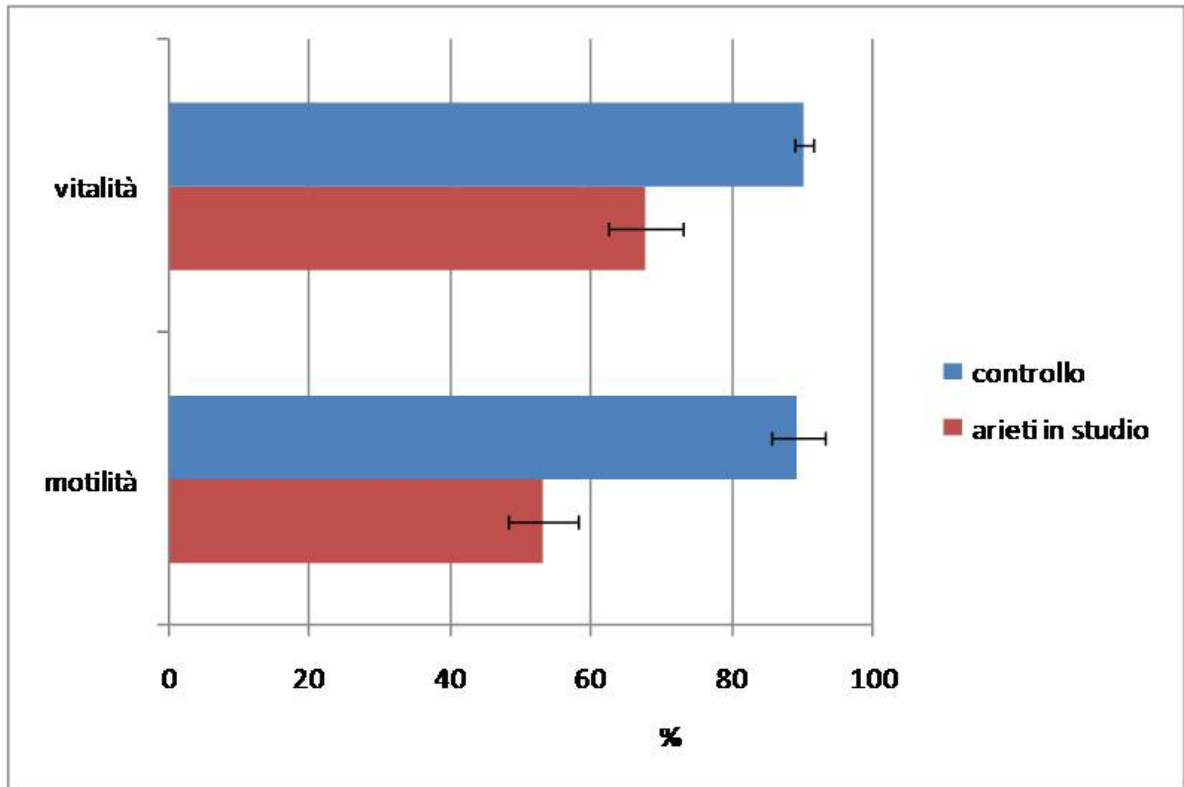


Grafico 1. Confronto fra i livelli di vitalità e motilità degli arieti sottoposti a sperimentazione con i livelli standard del nostro laboratorio.

A 44 μ l di ciascun campione sono stati aggiunti 6 μ l del nostro standard interno, Guanosina 1mM, a cui sono stati aggiunti 50 μ l di KCl 50 mM in HCl 10 mM. Di seguito i campioni sono stati lasciati per 40 minuti in agitazione in ghiaccio e 15 minuti in centrifuga a 15000 rpm. Recuperato il surnatante, i campioni sono stati analizzati tramite una elettroforesi capillare interfacciata ad una sorgente ESI-MS. Per l'elettroforesi è stato utilizzato acido formico 1M come BGE, una injection del campione di 50 mbar per 90 secondi seguita da una injection di 60 secondi di BGE. Una polarità positiva di 20 kV. Shealth liquid composto da metanolo / acqua in rapporto di 1/1 con l'aggiunta dello 0,1 % di Acido formico con un flusso di 0,15 μ l / min. 3500 V con un Nebulaizer gas di 10 psi, dry gas di 5 l/min e una dry temperature di 300 °C. Dall'analisi degli spettri ottenuti sono stati estratti gli elettroferogrammi che corrispondevano a 9 metaboliti contenuti nel plasma seminale, di ciascun picco è stata misurata l'area che è stata normalizzata con quella del controllo esterno. I metaboliti

analizzati sono stati: colina, glutamina, acido glutammico, istidina, carnitina, arginina, tirosina, acetilcarnitina e melatonina. La scelta di analizzare queste molecole è stata dettata dal fatto che sono tutte implicate nei meccanismi di maturazione e metabolismo degli spermatozoi e quindi della qualità del seme.

La colina è una molecola importante perché implicata nella costituzione della membrana degli spermatozoi sotto forma di fosfatidilcolina, è inoltre un precursore intracellulare della betaina, utilizzata dalle cellule come osmolita ed implicata nella sintesi del glutatione.

Glutamina, Acido glutammico, Istidina, Arginina e Tirosina sono tutti aminoacidi implicati come osmoliti cellulari, utilizzati nella regolazione del volume cellulare, la cui carenza è stata messa in relazione con varie disfunzioni spermatiche quali ad esempio azoospermia, oligospermia.

L-carnitina e Acetil carnitina sono correlate con il numero degli spermatozoi e la loro motilità progressiva. La Melatonina è un antiossidante che può essere secreta a livello locale nel testicolo ed è stato visto che gioca un ruolo importante nella difesa degli spermatozoi dai ROS.

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante test One way ANOVA utilizzando il software Statgraphics.

5.3. RISULTATI

I risultati sono riepilogati nei grafici seguenti: possiamo evidenziare un effetto positivo della melatonina a 90 giorni dal trattamento per quanto riguarda colina, glutamina, acido glutammico, carnitina, arginina, acil-carnitina e melatonina. Un immediato effetto positivo a 30 giorni dalla somministrazione del trattamento si può osservare per glutamina, carnitina e melatonina.

Come si può evidenziare nel grafico 2 la concentrazione di melatonina, nel plasma seminale degli arieti controllo si mantiene praticamente invariata durante i 120 giorni dal trattamento mentre nel gruppo dei trattati si osserva un incremento significativo fino a 90 giorni dal trattamento per poi ritornare a livelli basali dopo 120 giorni.

Nel grafico 3 è mostrato l'andamento delle concentrazioni di carnitina durante i 120 gg dal trattamento degli arieti con gli impianti di melatonina, rispetto al gruppo controllo. Come si evince dal grafico, nel gruppo controllo non si ha nessuna variazione statisticamente significativa nel periodo, mentre nel gruppo dei trattati la concentrazione di carnitina cresce significativamente fino al 90 giorno, per poi tornare a livelli simili a quelli del controllo dopo 120 giorni.

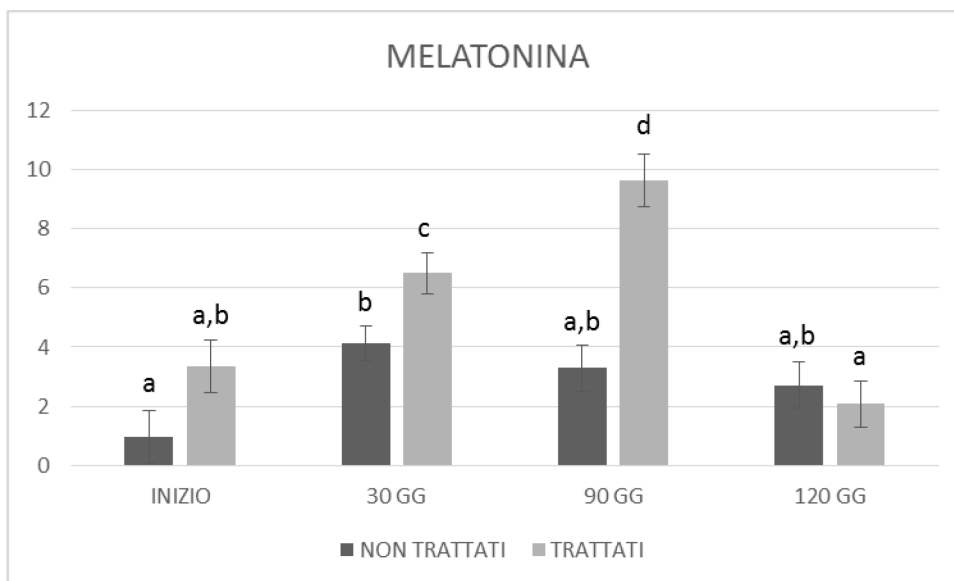


GRAFICO 2. Rappresentazione grafica dei livelli di MELATONINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Diverse lettere indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

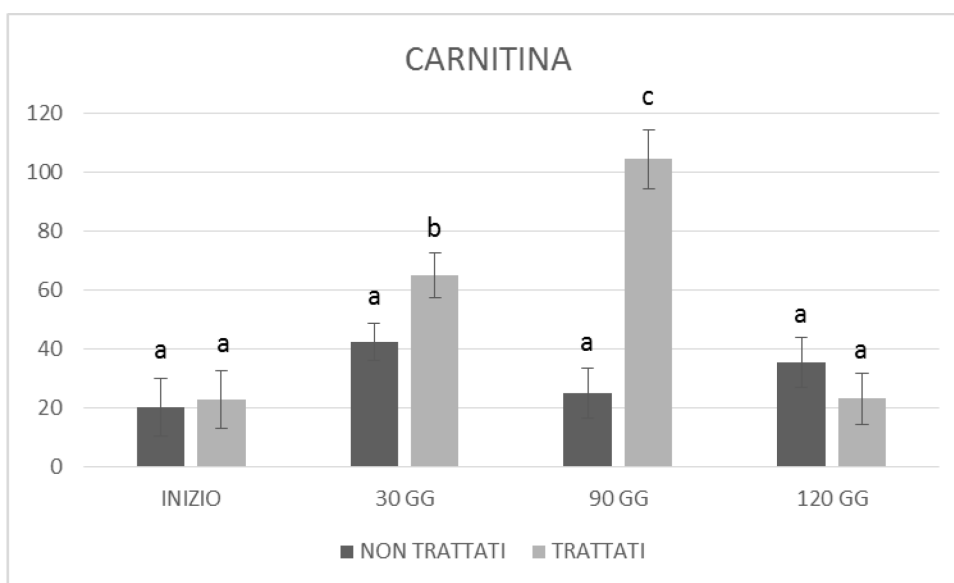


GRAFICO 3. Rappresentazione grafica dei livelli di CARNITINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

L'andamento dell'acetilcarnitina, descritto nel grafico 4, non si discosta da quello della carnitina, con una differenza tra gruppo controllo e trattati solo al 90° giorno di trattamento.

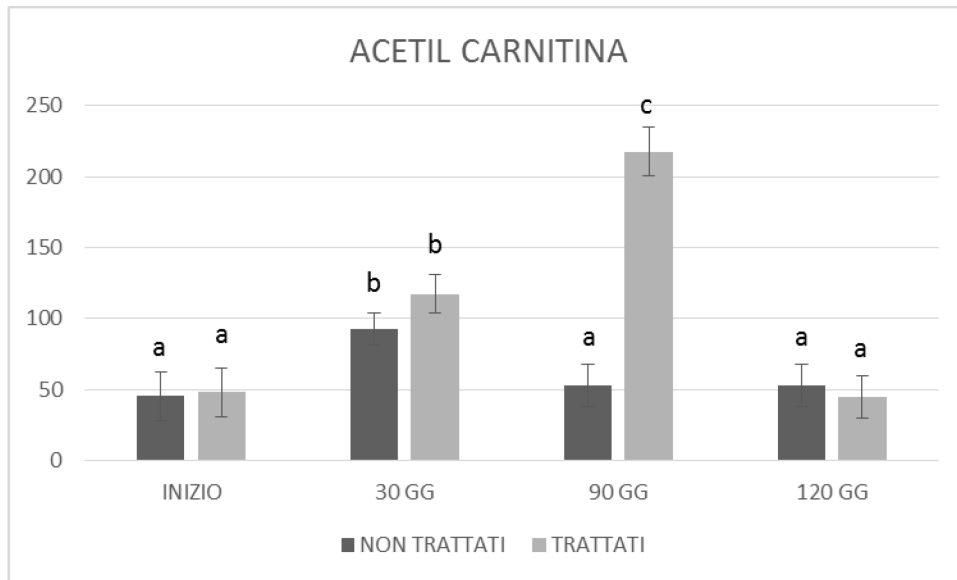


GRAFICO 4. Rappresentazione grafica dei livelli di ACETIL CARNITINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Come si può evidenziare nel grafico 5 la concentrazione di glutamina riflette l'andamento ottenuto per la melatonina. Nel gruppo controllo si mantiene praticamente invariata durante i 120 giorni dal trattamento mentre nel gruppo dei trattati cresce significativamente fino a 90 giorni dal trattamento per poi ritornare a livelli basali dopo 120 giorni. Per quanto riguarda la concentrazione di acido glutammico nel plasma seminale, riassunta nel grafico 6 possiamo evidenziare nel gruppo controllo un leggero incremento al 30° giorno per poi degradare lentamente fino a livelli basali 120giorni. Nel gruppo degli animali trattati con melatonina la crescita si ha fino a 90 giorni dall'inizio del trattamento per poi tornare a livelli basali a 120 giorni.

La concentrazione di istidina nei gruppi trattati e controllo, mostrata nel grafico 7, ha un andamento parallelo durante i 120 giorni di analisi mostrando una maggior concentrazione a 90gg ma senza differenze significative fra i due gruppi.

Le concentrazioni di arginina nel plasma seminale di arieti controllo cresce leggermente ma statisticamente durante i primi 90 giorni dall'inizio dell'analisi e si riporta a livelli basali a 120 giorni mentre il gruppo dei trattati presenta un aumento

statisticamente significativo dopo 90 giorni dal trattamento, rispetto al controllo (Grafico 8).

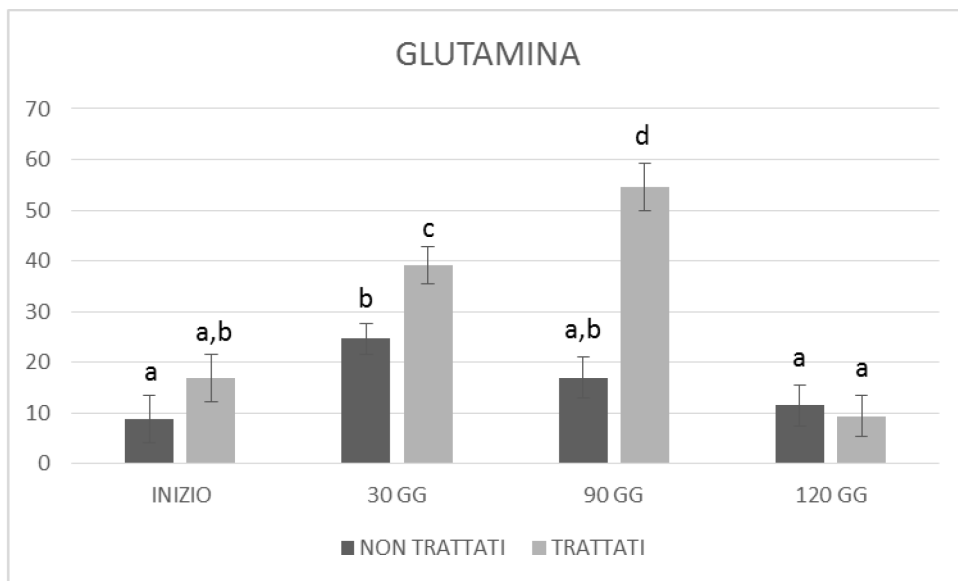


GRAFICO 5 Rappresentazione grafica dei livelli di GLUTAMINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

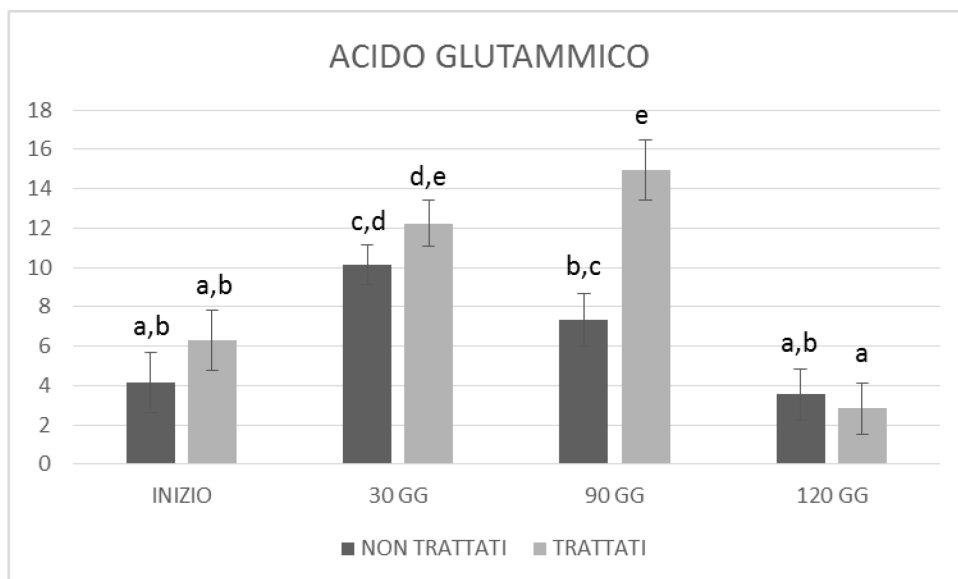


GRAFICO 6. Rappresentazione grafica dei livelli di ACIDO GLUTAMMICO nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

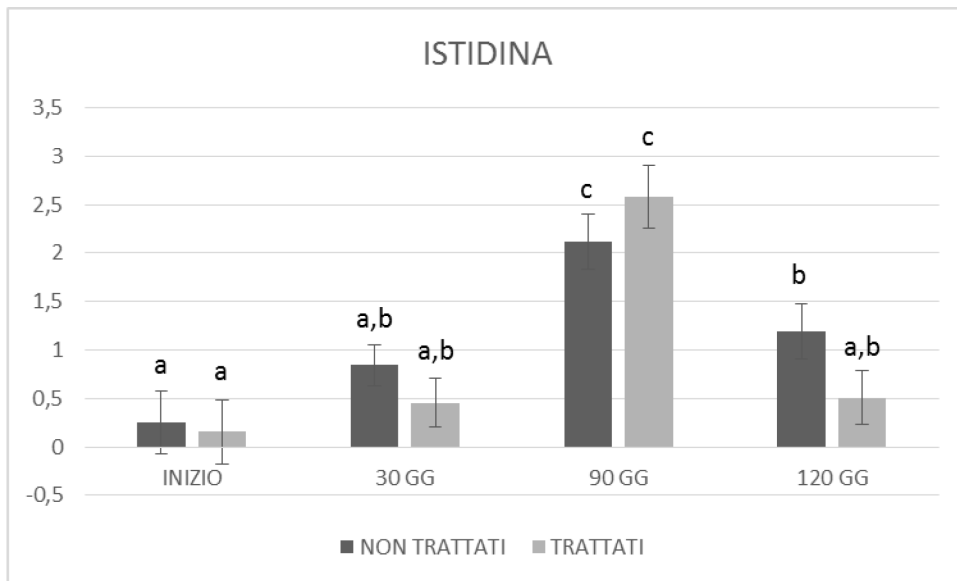


GRAFICO 7 Rappresentazione grafica dei livelli di ISTIDINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

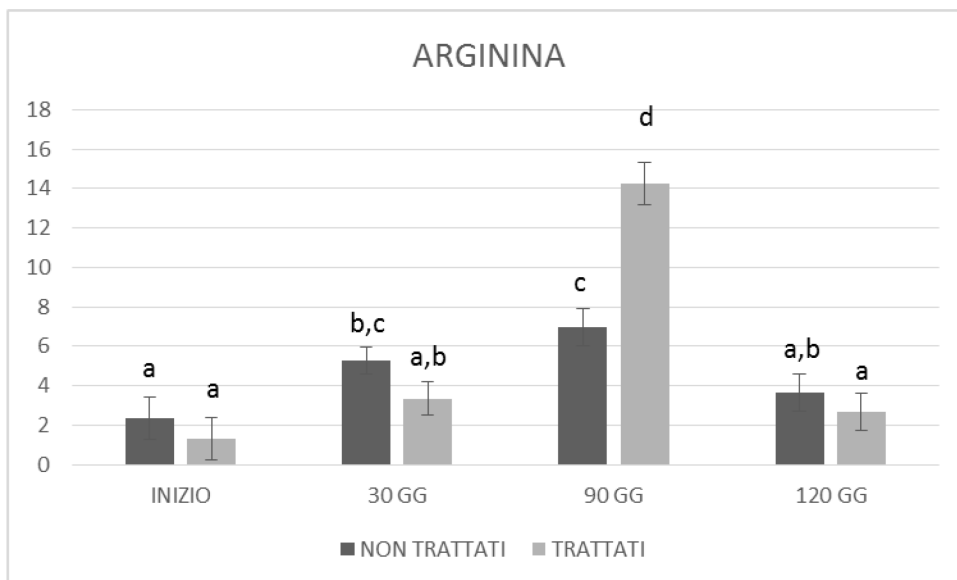


GRAFICO 8. Rappresentazione grafica dei livelli di ARGININA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

L'andamento della tirosina, come descritto nel grafico 9, presenta un andamento lineare durante tutto il periodo di analisi nel gruppo controllo mentre nel gruppo dei trattati presenta un aumento di concentrazione statisticamente significativo nei primi 30 giorni.

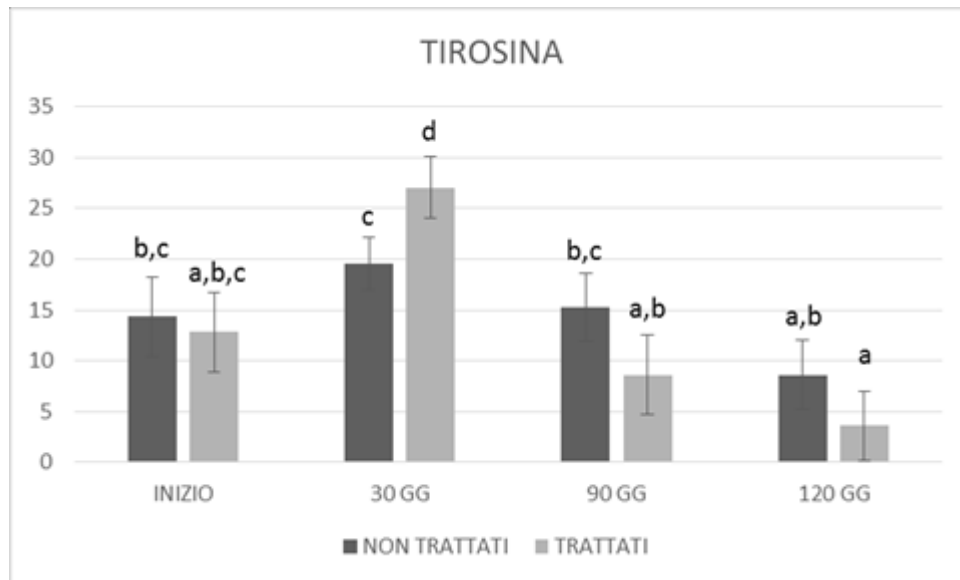


GRAFICO 9. Rappresentazione grafica dei livelli di TIROSINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Per quanto riguarda la concentrazione di colina nel plasma seminale, riassunta nel grafico 10 possiamo evidenziare nel gruppo controllo un leggero incremento al 30° giorno che si mantiene fino al 90° giorno per poi tornare a livelli basali dopo 120 giorni. L'andamento nel gruppo trattato con melatonina è praticamente identico tranne che per un picco di concentrazione maggiore a 90 giorni di trattamento rispetto agli altri tempi analizzati.

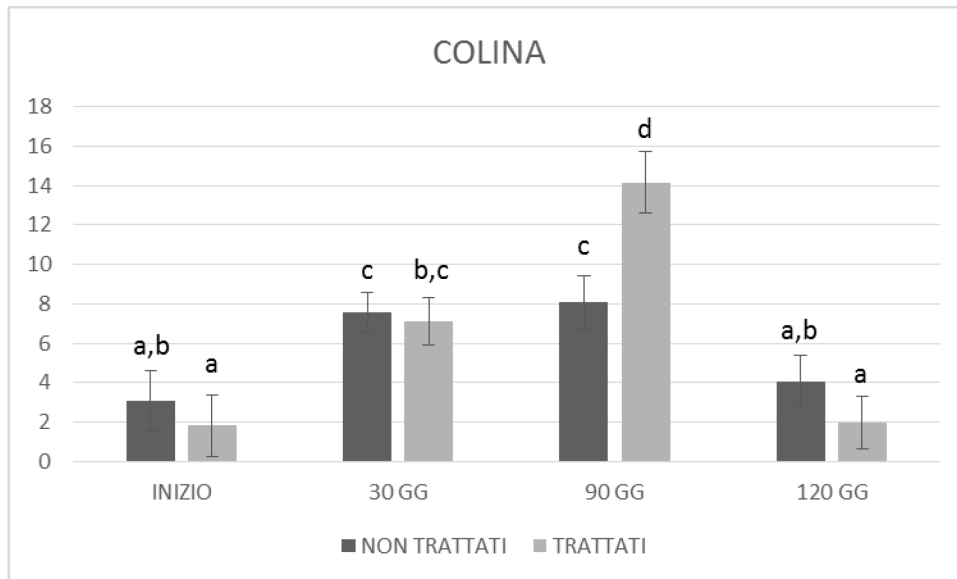


GRAFICO 10. Rappresentazione grafica dei livelli di COLINA nel plasma seminale dei due gruppi di arieti (trattati e non trattati) valutata dal momento dell'inserimento dell'impianto di melatonina fino ai 120 giorni successivi. Le lettere diverse indicano una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$).

5.4. DISCUSSIONE

I dati di questo esperimento hanno messo in evidenza un'influenza notevole degli impianti di melatonina in arieti ipofertili, sulle caratteristiche metabolomiche del plasma seminale in periodo non riproduttivo.

Innanzitutto abbiamo voluto vedere le concentrazioni di melatonina nel plasma seminale in seguito al trattamento con impianti di melatonina.

Numerosi studi hanno mostrato un effetto positivo diretto della melatonina sulle cellule spermatiche. Un incremento della qualità spermatica da parte di alti livelli di melatonina esogena è stato evidenziato nell'uomo (Ortiz et al, 2011). Trattamenti in vitro con melatonina hanno mostrato un effetto benefico in vari parametri di qualità di spermatozoi di varie specie animali (Ortiz et al, 2011; Casao et al, 2010d; Jang et al, 2010). Tutti gli effetti positivi della melatonina sugli spermatozoi sono stati evidenziati sia in specie non stagionali (uomo e suino) che in stagionali con fotoperiodo positivo (cavalli) o negativo (arieti e cervi) che suggeriscono che l'azione di questa indolamina sugli spermatozoi è indipendente dalla regolazione dell'asse ipotalamo ipofisi testicolo. L'azione diretta della melatonina sulle cellule spermatiche è stata messa in relazione con la sua attività antiossidante e con la sua abilità a passare attraverso le membrane, agendo quindi sia a livello intracellulare che extracellulare (Reiter et al, 2000). Inoltre è stata descritta anche la presenza di recettori nel tessuto epididimale (Shiu et al, 1997)

e nelle cellule del Leidig suggerendo un effetto diretto della melatonina sul testicolo (Sirotkin and Schaeffer, 1997). Recettori per la melatonina sono stati identificati negli spermatozoi di ariete e sono stati associati con la capacitazione dello spermatozoo (Casao et al, 2012b; Cebrian-Perez et al, 2013).

La presenza di melatonina è stata descritta nel plasma seminale con variazioni stagionali parallele a quanto osservato nel plasma sanguigno (Casao et al, 2010). In arieti di razza Aragonesa, trattati con melatonina esogena, il livello presente nel plasma seminale incrementa nella prima settimana in maniera repentina e poi più gradualmente nelle settimane successive, con un picco intorno alla 9° settimana per poi diminuire gradatamente nelle settimane successive fino a livelli basali intorno alla 19° settimana (Casao et al, 2013). I nostri dati confermano anche nella razza sarda la presenza e l'andamento della concentrazione di melatonina nel plasma seminale. Negli arieti non trattati mantiene livelli basali per tutta la durata della sperimentazione mentre negli individui trattati presenta una concentrazione maggiormente elevata già a 30 giorni e un picco a 90 giorni per poi ritornare a livelli basali a 120 giorni. Probabilmente la natura lipofila della melatonina, che permette una rapida distribuzione in tutti i tessuti e i fluidi organici, potrebbe spiegare i livelli di melatonina misurati nel plasma seminale, che sembrerebbero essere il risultato della farmacocinetica degli impianti utilizzati. Questi impianti infatti sono stati progettati per mantenere alti livelli di questo ormone per 40-70 giorni, anche se è stato dimostrato che possono rilasciare melatonina per più di 100 giorni (Zuniga et al, 2002). Negli arieti trattati il livello di melatonina nel plasma seminale si è rivelato maggiore rispetto a quelli non trattati per oltre 90 giorni che potrebbe anche essere dovuto alla dose farmacologica adottata di 3 impianti per animale, maggiore rispetto a all'unica dose consigliata per le pecore.

Casao e coll. (2013) hanno relazionato positivamente la melatonina con le concentrazioni di testosterone nel plasma seminale che potrebbero essere dovute ad un diretto effetto della melatonina sull'asse ipotalamo ipofisi testicolo. Il testosterone presente nel plasma seminale deriva dai tubuli seminiferi e dalla rete testis ed è essenziale per la spermatogenesi e per determinare la qualità degli spermatozoi (Ruwampura et al, 2010). Parallelamente Casao e coll. (2013) hanno messo in evidenza nel plasma seminale un incremento delle concentrazioni di estradiolo, dovuto a un aumento delle concentrazioni dell'attività aromatasica, correlata con la motilità spermatica in varie specie animali (Casao et al, 2010d). Un effetto indiretto della melatonina, modulato dagli ormoni, potrebbe essere alla base delle altre variazioni osservate nel plasma seminale.

La carnitina è un aminoacido idrosolubile presente in vari organismi la cui concentrazione varia in relazione alla specie, al tipo tissutale e allo stato nutrizionale dell'animale (Vaz e Wanders 2002). Oltre ad essere un importante aminoacido è anche un cofattore essenziale per il metabolismo degli acidi grassi e gioca un ruolo importante nella generazione di energia metabolica promuovendo il trasporto degli acidi grassi all'interno del mitocondrio. La carnitina è presente ad alte concentrazioni nell'epididimo e nello spermatozoo e quella presente nei fluidi epididimali è utilizzata da queste cellule nella produzione di energia (Ruiz-Pesini et al, 2001). La L-carnitina è recuperata dal plasma sanguigno da parte delle cellule epiteliali del lume epididimale ed è secreta nel lume epididimale mediante trasporto attivo con carrier specifici regolati dagli androgeni (Cooper et al, 1986) che determina un accumulo di questa sostanza nel lume epididimale. L'acetilcarnitina è l'estere della carnitina maggiormente presente nel plasma seminale (Jeulin e Lewin, 1996). Durante il transito degli spermatozoi nell'epididimo, in cui la concentrazione della carnitina aumenta, si ha un accumulo passivo di questa molecola negli spermatozoi, per gradiente di concentrazione, in cui viene immediatamente acetilata (Brooks et al, 1979). La funzione della carnitina accumulata dallo spermatozoo sembrerebbe quella di tamponare l'eccesso di acetil-CoA prodotto nel mitocondrio sotto forma di acetilcarnitina. Nello spermatozoo, differentemente da altri tipi cellulari, questo sistema agirebbe come protezione dell'attività della piruvato deidrogenasi, un enzima chiave per la respirazione mitocondriale, che catalizza la decarbossilazione del piruvato ad acetil-CoA e che è inibito dal prodotto della sua attività. L'acetilcarnitina viene trasportata nel citoplasma con un antiporto acetilcarnitina/L-carnitina per azione di una translocasi presente sulla membrana mitocondriale, per cui si ha lo stoccaggio di gruppi acetilici nel citoplasma, adducendo un importante ruolo della coppia metabolica L-carnitina/acetilcarnitina nel metabolismo dello spermatozoo (Jeulin e Lewin, 1996). La concentrazione della acetilcarnitina è stata inoltre correlata a vari marcatori di qualità spermatica quali la concentrazione di spermatozoi nell'eiaculato, la vitalità, l'integrità del DNA mitocondriale, la capacità di penetrare il muco cervicale e la motilità, (De Rosa et al, 2005; Johansen & Bohmer, 1979) attribuendo alla concentrazione di carnitina e acilcarnitina nel plasma seminale un titolo di marcatore biochimico della funzionalità epididimale e spermatica. I nostri dati hanno messo in evidenza un incremento della concentrazione nel plasma seminale sia di carnitina che acilcarnitina nei 90 giorni successivi al trattamento con melatonina rispetto al plasma seminale degli arieti non trattati. Il miglioramento delle concentrazioni di carnitina e acil carnitina potrebbe essere dovuto ad un incremento dell'attività del trasporto attivo, contro gradiente di concentrazione, presente nelle membrane delle cellule

epiteliali dell'epididimo. Il principale trasportatore responsabile delle alte concentrazioni epididimali di carnitina è l'OCTN2 (Organic Cation/Carnitine Transporter) differentemente espresso nei vari tratti dell'epididimo (Rodriguez et al, 2002) ed è stata dimostrata una funzione regolatoria del testosterone sui trasportatori di cationi organici, e sul trasporto attivo della carnitina nel lume dell'epididimo sia dipendente da testosterone (Cooper et al, 1986). Nel nostro lavoro non abbiamo valutato le concentrazioni di testosterone nel plasma seminale degli arieti trattati con melatonina ma ipotizziamo che parallelamente all'aumento delle concentrazioni di melatonina ci sia anche un aumento di testosterone, come precedentemente dimostrato da Casao e coll. (2013) in arieti di razza Aragonesa. Questo agirebbe positivamente stimolando l'attività dei trasportatori della carnitina del lume epididimale, incrementandone la concentrazione nel plasma seminale e migliorando la qualità del materiale seminale. D'altronde la somministrazione farmacologica della carnitina è utilizzata come terapia nel miglioramento di molti casi di infertilità maschile (Lenzi et al, 2003; Balercia et al, 2005). La maggior parte degli aminoacidi presenti nel plasma seminale vengono prodotti a livello di tubuli seminiferi e dell'epididimo, e solo in parte nelle ghiandole sessuali accessorie (Ahluwalia e Graham, 1966). La loro concentrazione tende ad aumentare dopo l'eiaculazione a causa dei massivi processi di catabolismo proteico che si instaurano nel seme. Il pattern di alcuni aminoacidi nel fluido testicolare è differente da quella osservata nel sangue suggerendo la loro secrezione da parte delle cellule testicolari e in particolare il glutammato e l'arginina sono presenti in concentrazioni molto più elevate rispetto agli altri aminoacidi. Nel fluido proveniente dall'epididimo, tutti gli aminoacidi, tranne la glicina, sono presenti in maggiori concentrazioni rispetto al fluido testicolare mentre la concentrazione nel plasma seminale è minore rispetto al plasma epididimale, probabilmente a causa del riassorbimento selettivo di liquido nella testa dell'epididimo. Nel plasma di arieti vasectomizzati non si riscontra alcuna differenza rispetto alla loro concentrazione del plasma sanguigno (Setchell et al, 1967). Aminoacidi liberi del plasma seminale stimolano l'attività metabolica degli spermatozoi (Newmark et al, 1967), incrementano la sopravvivenza degli spermatozoi e mostrano funzioni detossificanti (Patel et al, 1998; Ibrahim and Boldizar, 1981), e sono stati messi maggiormente in relazione con le cellule testicolari piuttosto che con lo spermatozoo (Setchell et al, 1967). La concentrazione di aminoacidi liberi è stata direttamente correlate alla qualità degli spermatozoi (Čeřovský et al, 2007).

Dai nostri dati possiamo evincere un diverso comportamento della concentrazione dei 5 aminoacidi analizzati. La concentrazione della glutammina cresce parallelamente a quella della melatonina fino a 90 giorni per poi tornare a 120 giorni a livelli simili al

controllo, mentre l'acido glutammico e l'arginina si distinguono solamente con livelli maggiori rispetto al controllo dopo 90 giorni. La concentrazione degli aminoacidi basici, e in particolare dell'arginina, è stata inversamente correlata a varie classi di disfunzioni spermatiche nell'uomo (Papp et al, 1983).

La concentrazione di tirosina cresce subito dopo la somministrazione di melatonina, probabilmente dovuta a un incremento del suo metabolismo e della sua concentrazione nel plasma sanguigno, causato dall'azione stimolante di questa indolamina sull'attività tiroidea. La presenza di tirosina nel plasma seminale è stata relazionata inoltre all'attività antiossidante di questo fluido. van Overveld e coll. (2000), in una sperimentazione mirante a valutare il bilancio della presenza dei ROS e delle proprietà antiossidanti delle molecole presenti nel plasma seminale, hanno evidenziato un contributo della tirosina alla capacità antiossidante totale del plasma seminale (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity TEAC), che potrebbe agire sinergicamente con la melatonina nel controllo dei ROS in individui con patologie spermatiche.

La concentrazione di istidina invece non varia nei trattati rispetto al controllo, per cui non viene influenzata dalla melatonina. L'azione della melatonina, diretta o mediata dagli ormoni androgeni, potrebbe incrementare l'azione dei trasportatori di membrana degli aminoacidi incrementando la concentrazione di aminoacidi. L'azione degli androgeni, favorendo l'attività delle cellule testicolari e la qualità degli spermatozoi, incrementa la richiesta di queste cellule di fattori trofici. In quest'ottica gli aminoacidi potrebbero servire sia da substrati energetici che da mattoni per la costruzione di nuove proteine o la sintesi di basi puriniche e pirimidiniche (glutammina) necessarie per la sintesi di acidi nucleici.

Un effetto positivo dell'azione della melatonina si può osservare anche sulle concentrazioni di colina che dopo 90 giorni di trattamento assume concentrazioni nel plasma seminale maggiori rispetto a quelle dei controlli. Questo potrebbe essere messo in relazione con un migliore turnover delle membrane degli spermatozoi. Il legame tra le concentrazioni di colina e la fertilità maschile è stata evidenziata in un lavoro riguardante la *Drosophila* (Geer, 1967). In questo lavoro è stata riportata un'adeguata disponibilità di colina in relazione alla motilità spermatica. Recentemente (Johnson et al, 2012) è stata proposta una correlazione tra la motilità spermatica e la capacità dello spermatozoo di resistere a stress osmotico con l'attività della colina deidrogenasi, un enzima che trasforma la colina in betaina (NNN-trimetil glicina). Sarebbe la betaina e la sua attività di donatrice di gruppo metilici implicata nella protezione delle membrane spermatiche e nella regolazione del volume cellulare (Garcia-Perez e Burg, 1991). L'incremento della colina in seguito al trattamento con

melatonina suggerisce una minore attività di questo enzima e di conseguenza una migliore condizione dello spermatozoo, che non ha la necessità di recuperare stress osmotici per cui potrebbe essere considerata un marcatore di stress osmotici e correlata alla funzionalità dello spermatozoo.

In conclusione possiamo affermare che il trattamento con inserti di melatonina in arieti con problemi di funzionalità spermatica migliora l'ambiente testicolare incrementando la qualità del plasma seminale. È stata infatti misurato un incremento della concentrazione di molecole correlate direttamente alla qualità dello spermatozoo, la cui determinazione potrebbe essere utilizzata come biomarcatore della funzionalità spermatica.

6. ESPERIMENTO 2: DETERMINAZIONE DELLE CARATTERISTICHE BIOCHIMICO-FISIOLOGICHE DI EIACULATI DI STALLONI IN RELAZIONE ALL'ETÀ DELL'ANIMALE

La capacità fecondante degli eiaculati di stallone è dipendente principalmente dalle caratteristiche fisiologiche dello spermatozoo che gli devono garantire la possibilità di arrivare fino alla giunzione utero tubarica e lì attendere l'arrivo dell'ovocita ovulato per poterlo fecondare. La valutazione dell'eiaculato è fondamentale per poter garantire la massima efficienza nelle procedure di inseminazione strumentale e dei piani di riproduzione assistita.

Naturalmente per poter valutare le caratteristiche del materiale seminale è necessario recuperarlo dagli stalloni. Esistono diverse tecniche per recuperare il materiale seminale: preservativo, elettro eiaculazione e vagina artificiale. Quest'ultimo è quello maggiormente seguito in quanto fornisce maggiori garanzie in termini di: affidabilità, qualità del prelievo, irrilevanza dei costi. Attraverso la vagina artificiale si permette lo sviluppo del riflesso di eiaculazione e si impedisce che si creino degli shock termici al materiale seminale.

Allo stato attuale non esiste un test in grado di permettere singolarmente la valutazione della capacità fecondante di un campione spermatico, tuttavia la valutazione di alcune caratteristiche possono aiutare a predirne la potenziale fertilità. Le caratteristiche dell'eiaculato ritenute importanti per determinarne il potenziale di fecondazione sono riassunte nella tabella 1 mentre nella tabella 2 sono riassunti i principali parametri fisiologici e nella tabella 3 alcuni parametri biochimici dell'eiaculato di stallone.

Volume dell'eiaculato	Concentrazione spermatica	Motilità spermatica	Vitalità spermatica	Anomalie spermatiche
-----------------------	---------------------------	---------------------	---------------------	----------------------

TABELLA 1. Parametri necessari per la valutazione dell'eiaculato.

Volume ml	Conc Spz (x10 ⁹)	Spz mobili (%)	Spz normali (%)	Proteine gr/dl	pH	Fruttosio mg/dl	Inositolo ng/dl	Sorbitolo ng/dl
60 -100	5 - 15	40 - 75	60 - 90	1.0	7.2/7.8	2	20 - 47	20 - 60

TABELLA 2. Parametri fisiologici dell'eiaculato di stallone.

Frazione sperma	Provenienza	Aspetti fisici	Caratteri biochimici
Fase PrespermatICA	Ghiandole uretrali	Acquosa	Alto contenuto in NaCl, privo di glicerilfosfatidil colina (GPC), ergotioneina e citrato
Ricca di spermatozoi	Epididimo ed ampolla	Lattiginosa, non viscosa	Elevato concentrazioni in spermI, alto GPC Ergotioneina e Citrato
Fase PostspermatICA	Vescicola seminale	Molto viscosa	Scarsa concentrazione di spermI, basso GPC, elevato Citrato
Fase di sgocciolamento	Ultima porzione dell'epididimo	Acquosa	Priva di spermI

TABELLA 3. Caratteristiche biochimiche dell'eiaculato di stallone.

La valutazione del volume e della qualità del materiale seminale deve essere analizzato immediatamente dopo il prelievo. La registrazione della quantità del prelievo offre l'opportunità di poter effettuare il calcolo del numero totale di spermatozoi. Questo calcolo ci permette di determinare il numero di femmine che possono essere inseminate con l'eiaculato raccolto.

La tabella 4 riepiloga i tempi del ciclo produttivo degli spermatozoi di stallone dal momento della differenziazione nel tubulo seminifero all'ingresso nel dotto deferente.

Ciclo tubulo seminifero	Testa epididimo	Corpo epididimo	Coda epididimo	Totale
55	1	2	6	64

TABELLA 4. Tempo di formazione degli spermatozoi nel tubulo seminifero e di permanenza minima nell'epididimo degli spermatozoi di stallone (gg.).

Il miglioramento delle tecniche di analisi biochimico fisiologiche e l'avvento dell'informatica ha permesso di sviluppare software particolari (Computer Assisted Sperm Analysis – CASA) che, interfacciati a un microscopio ottico munito di piastra riscaldata e ingrandimento 200x-400x, hanno contribuito a migliorare la valutazione degli spermatozoi mediante l'analisi di un pannello di parametri ritenuti indicatori della funzionalità spermatica. Tra gli altri, oltre alla concentrazione e alla vitalità spermatica, varie determinazioni della motilità di cui particolarmente importanti quella progressiva

e rettilinea e la concentrazione dell'ATP, molecola energetica utilizzata dallo spermatozoo principalmente per permettere la motilità del flagello e garantire l'avvicinamento all'ovocita. Tutte queste grandezze prese collettivamente sono relazionabili al numero di spermatozoi che hanno la capacità di risalire la cavità uterina fino alla giunzione utero-tubarica e di penetrare l'ovocita maturo nel processo di fecondazione.

Le caratteristiche del materiale seminale sono influenzate da diversi fattori che possono essere: diversità individuale in relazione alle caratteristiche genetiche, stagionalità, stato di nutrizione, grado di stimolazione sessuale, frequenza eiaculatoria ed età.

Siamo a conoscenza che ogni singolo individuo manifesta caratteristiche genetiche differenti rispetto ad un altro a meno che non derivino dalla stessa cellula uovo. Questa diversità rappresenta l'aspetto più importante nei meccanismi di adattamento alle mutevoli condizioni climatiche ed al processo evolutivo. Su questa base si costruisce il processo di selezione genetica operato dall'uomo per scegliere gli individui più capaci per svolgere un ben preciso ruolo (corsa piana, corsa ad ostacoli, percorsi di lunga distanza, produzione di carne; Musters et al, 2013).

La stagione influenza le caratteristiche fisiche e biochimiche del materiale seminale. Allo stesso tempo i livelli ematici degli ormoni, il comportamento sessuale. La produzione spermatica e la libido degli stalloni sono in relazione al periodo stagionale e alla posizione equatoriale, risultano massime nel corso della primavera ed estate e minime nell'autunno ed inverno (Chemineau et al, 2008). Questa caratteristica è frutto della risposta della specie alle condizioni meteo-vegetative che si registrano nel corso dell'anno. Tutti gli individui tendono ad avere nel corso della loro esistenza la più alta idoneità, intesa come capacità di lasciare in eredità i propri geni. L'animale investe elevate quote di energia per ottenere un successo riproduttivo. Se consideriamo che, alle nostre latitudini, la migliore stagione dell'anno, in termini di temperatura e produzione vegetale, sia la primavera. Risulta chiaro che gli animali nel corso della loro evoluzione si siano sincronizzati a partorire in questa stagione che offre maggiori possibilità di sopravvivenza per il piccolo. Considerando la durata della gravidanza (11 mesi) apparirà evidente come il periodo migliore per l'accoppiamento risulti la primavera. E' evidente che a questa condizione si sono adattati entrambi i generi, per cui gli stalloni in primavera avranno livelli di testosterone circolanti elevati e buona qualità di materiale seminale (da Silva et al, 2012). L'animale è in grado di leggere la durata del giorno e quindi delle stagioni attraverso la melatonina, ormone che viene prodotto dall'epifisi solo durante le ore di buio. Per cui maggiore durata della notte maggiori livelli circolatori di melatonina (autunno-inverno).

Lo stato nutrizionale influenza direttamente tutte le produzioni dell'organismo e di conseguenza anche l'eiaculato. E' nota l'influenza positiva dell'ormone leptina, che misura lo stato nutrizionale dell'animale, sulla attività riproduttiva a livello ipotalamico, influenzando la liberazione del GnRH ormone che controlla il rilascio delle gonadotropine ipofisarie (Buff et al, 2005). L'azione positiva dell'alimentazione sulla efficienza riproduttiva non va vista solo in termini di quantità come condizione corporale ma anche come qualità della dieta. Proprio negli stalloni sono stati segnalati gli effetti positivi di alcune sostanze ad azione nutraceutica come gli acidi polinsaturi contenenti l'acido docoesanoico presenti nella dieta sulla capacità riproduttiva ed in particolare sulla qualità della produzione spermatica (Brinsko et al, 2005).

Il livello di stimolazione sessuale svolge un ruolo importante nella determinazione della quantità e qualità dell'eiaculato (Allen e Wilsher, 2012). I palafrenieri sono a conoscenza di questo aspetto e lo utilizzano spesso negli stalloni pigri. Instaurare uno stato di eccitazione determina un miglioramento dell'eiaculato prodotto. In condizioni naturali lo stallone, nel corso del corteggiamento avvia la fase di eccitazione sulla femmina che a sua volta risponde con altri segnali. Ciò porta ad un crescendo di eccitazione fra entrambi i generi che porta alla fase finale di accettazione del maschio da parte della femmina e di conseguenza all'accoppiamento.

E' necessario considerare che, per la produzione degli spermatozoi occorre un certo tempo (tabella 4), per cui se si accelera il ritmo di prelievo di materiale seminale oltre un certo limite si ha una conseguente riduzione del volume e della concentrazione. Possiamo allo stesso tempo considerare che qualora il prelievo venga effettuato ad una frequenza molto bassa si registra, nelle prime sedute di raccolta, una scadente qualità di eiaculato. Il processo di produzione degli spermatozoi è continuo, la sede di deposito è rappresentata dalla coda dell'epididimo. Naturalmente lo stoccaggio non è infinito e con una permanenza protratta nel tempo, nonostante l'ambiente intraepididimale risulti particolarmente favorevole, si osserva una progressiva riduzione della funzionalità spermatica. La gran parte degli spermatozoi non eiaculati viene gradualmente eliminata con le urine. Gli spermatozoi non eliminati con le urine vanno incontro ad un progressivo processo di senescenza perdendo sia la capacità fecondante che il movimento ed al termine degenerano. Gli eiaculati recuperati dopo un lungo periodo di digiuno sessuale contengono concentrazioni elevate di spermatozoi invecchiati con evidenti segni di degenerazione.

La specie umana, insieme al cavallo, mostra segni di invecchiamento abbastanza simili, come ad esempio quella di incrementare il peso corporeo legati a squilibri di natura ormonale. Tuttavia differenze fra le specie sono state registrate come ad esempio la ialinizzazione delle pareti dei vasi ematici cerebrali presente nella specie umana ma

non in quella equina. Come è noto con l'avanzare dell'età si registra nella gran parte delle specie animali una riduzione della funzionalità testicolare sia in termini di livelli circolatori di ormoni dell'asse riproduttivo che di produzione di gameti. Ciò riveste un'importanza particolarmente elevata per i maschi di alcune specie che sono sottoposte a programmi di selezione genetica attraverso l'impiego della inseminazione strumentale come ad esempio la specie equina. Ebbene, una volta individuati all'interno di questa specie i maschi miglioratori, ci si attende proprio da questi stalloni un periodo particolarmente lungo della loro carriera riproduttiva in termini di fecondità. Processi degenerativi a carico del comparto interstiziale, per le cellule del Leydig e dei tubuli seminiferi, per le cellule del Sertoli del testicolo, sono stati segnalati in stalloni di età avanzata ma queste possono riguardare anche giovani soggetti (Gehlen et al, 2001). Spesso si assiste al fatto che allorché inizia la fase degenerativa, questa assume caratteri di avanzamento progressivo nel tempo che porta, in una prima fase, ad una limitata capacità riproduttiva e successivamente, nella fase finale, all'infertilità.

Tuttavia, esistono evidenze inconfutabili in ratti che, qualora si sviluppi in un soggetto di età avanzata un ambiente adatto al rinnovamento delle cellule del Leydig grazie all'attività di cellule staminali, è possibile mantenere elevato il livello del testosterone mantenendo di conseguenza elevata la funzione di spermatogenesi (Chen et al, 2010). Le informazioni presenti in letteratura sulle cellule del Sertoli appaiono contrastanti, si segnala una loro riduzione con il progredire dell'età (Jones and Berndtson, 1986) mentre altri non trovano alcuna differenza (Johnson et al, 1991).

Evidenze provenienti da studi sui ratti hanno mostrato che una senile degenerazione dell'attività testicolare può derivare dagli alti livelli di radicali liberi (ROS) prodotti dagli stessi testicoli (Chen and Zirkin, 1999). Pertanto si è ritenuto opportuno procedere ad una terapia a base di molecole ad azione antiossidativa per migliorare la funzionalità testicolare ma i risultati al momento appaiono ancora non completi (Lombardo et al, 2011).

6.1. SCOPO

Lo scopo era quello di verificare eventuali differenze sulle caratteristiche biochimico-fisiologiche di eiaculati raccolti mediante vagina artificiale da stalloni di età compresa fra 5 e 30 anni di età. Il nostro lavoro è stato portato avanti in collaborazione con il dr. Raffaele Cherchi, responsabile della sezione di Ippologia di AGRIS, con il quale si è avviata una attività di studio su un gruppo di 17 stalloni. Gli animali, di età compresa fra i 30 e i 5 anni di età, sono stati suddivisi in 3 gruppi. Nel gruppo 1: individui nati dal

1983 al 1988, composto da 4 soggetti; nel gruppo 2: individui nati dal 1993 al 1998, composto da 6 soggetti; nel gruppo 3: individui nati dal 2000 al 2008, composto da 7 soggetti. Gli stalloni, tutti di razza Anglo-Arabo, erano mantenuti nei recinti dei paddock della località di "Su Padru" in comune di Ozieri ed alimentati seguendo i criteri standard di alimentazione. Tutti gli animali erano donatori di materiale seminale, utilizzati da AGRIS come soggetti miglioratori, quindi addestrati al salto in vagina artificiale. Il prelievo del materiale seminale è stato eseguito seguendo le procedure standard adottate presso la stazione di "Su Padru" previa fase di corteggiamento e di eccitazione su una cavalla.

Età di nascita	Nome
1983	OSCAR DAY
1987	OREGON
1988	ALLORO
1988	ASCOT

TABELLA 5. Stalloni con la maggiore età (Gruppo 1)

Età di nascita	Nome
1993	CONCORAL
1993	FAIR PLAY
1994	VIDOC
1994	ROBINE
1998	KING SIZE
1998	CALIGOLA

TABELLA 6. Stalloni con l'età intermedia (Gruppo 2)

Età di nascita	Nome
2000	ERCULES
2001	FRAC DI MONTALBO
2002	O-PIF
2005	CLOUD Z
2006	BABALOU DE LIGNI
2006	NURACHI
2008	PANTUOSCO

TABELLA 7. Stalloni con la più giovane età (Gruppo3)

Per l'estrazione dell'ATP, un volume di eiaculato contenente 10^5 spermatozoi, è stato lavato con PBS per 2 volte mediante centrifugazione di 15 minuti a 1100 rpm e

aspirazione del surnatante. Il pellet ottenuto è stato lisato mediante l'aggiunta di 100 µl di TCA al 10%. Dopo agitazione al vortex, e centrifugazione a 3000g per 5 min il surnatante è stato prelevato e sottoposto a trattamento con etere. La fase acquosa è stata recuperata e utilizzata per la quantificazione in elettroforesi capillare.

10 pL dell'estratto contenente l'ATP sono stati analizzati mediante un sistema di elettroforesi capillare Agilent dotato di un rivelatore UV. Le condizioni elettroforetiche che hanno permesso la migliore efficienza dell'analisi di ATP all'interno degli spermatozoi sono state ottenute applicando 25 kV in polarità negativa a un capillare di silice (50 µm id e 52 cm di lunghezza totale, con la presenza della cella uv a 8,5 cm dalla fine del capillare). La separazione è stata effettuata a 30°C, utilizzando come tampone di corsa acetato di sodio 20 mmol/L a pH 3.8. Dopo ogni corsa il capillare è stato lavato per 0.5 minuti con 0.1 mmoli/L di HCl ed equilibrato con il buffer di corsa per 0.5 minuti. La separazione è stata monitorata ad una lunghezza d'onda di 259 nm. Il grafico 11 contiene i dati relativi al livello di concentrazione spermatica nei 3 gruppi di stalloni. Dall'esame dei dati si osserva che non esistono differenze statisticamente significative in relazione all'età ($P= 0,52$). Gli stalloni del gruppo 1 presentavano infatti una concentrazione di spermatozoi di (media± DS) $349,8\pm 274,9$ milioni di spermatozoi/ml, quelli del gruppo 2 di $390,4\pm 176,9$ milioni/ml e quella del gruppo 3 di $230,7\pm 224,9$ milioni/ml.

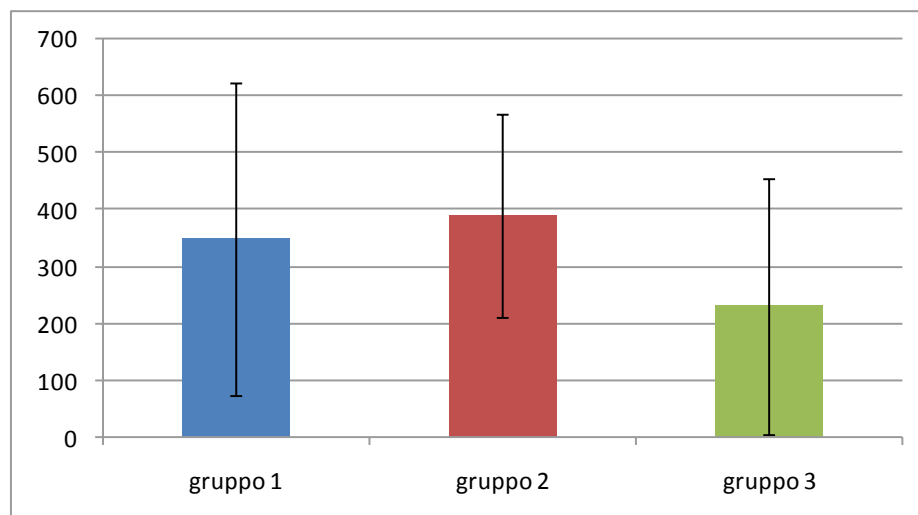


GRAFICO 11. Livelli di concentrazione spermatica fra i 3 gruppi di stalloni

Nel grafico 12 vengono riportati i dati relativi alla vitalità degli spermatozoi effettuata mediante Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA). Come si può osservare, il primo gruppo esprime una vitalità statisticamente maggiore ($P<0.01$) rispetto ai restanti

gruppi. Infatti le percentuali di spermatozoi vitali era (media± DS) $87,9 \pm 3,21\%$ nel gruppo 1, $65,37 \pm 10,42\%$ nel gruppo 2 e $46,50 \pm 18,65\%$ nel gruppo 3.

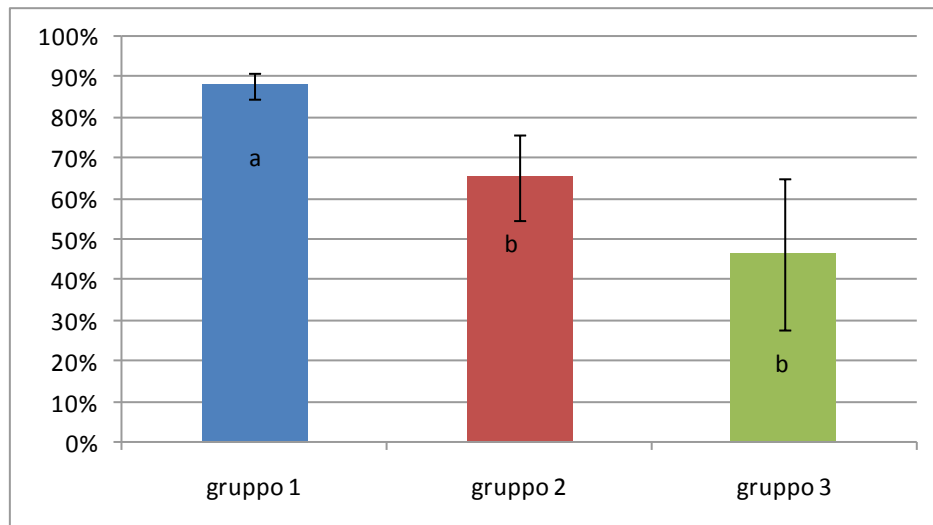


GRAFICO 12. Vitalità degli spermatozoi nei 3 gruppi di stalloni espressa in percentuale del totale degli spermatozoi analizzati (ANOVA: a vs b= $p < 0.01$).

Nel grafico 13 sono mostrati i valori di motilità progressiva in relazione alla totalità degli spermatozoi presenti negli eiaculati dei 3 gruppi di stalloni. I valori ottenuti non si differenziano significativamente con rapporti di (media± DS) $0,20 \pm 0,04$ nel gruppo 1, di $0,13 \pm 0,08$ nel gruppo 2 e $0,08 \pm 0,05$ nel gruppo 3 ($P = 0,124$).

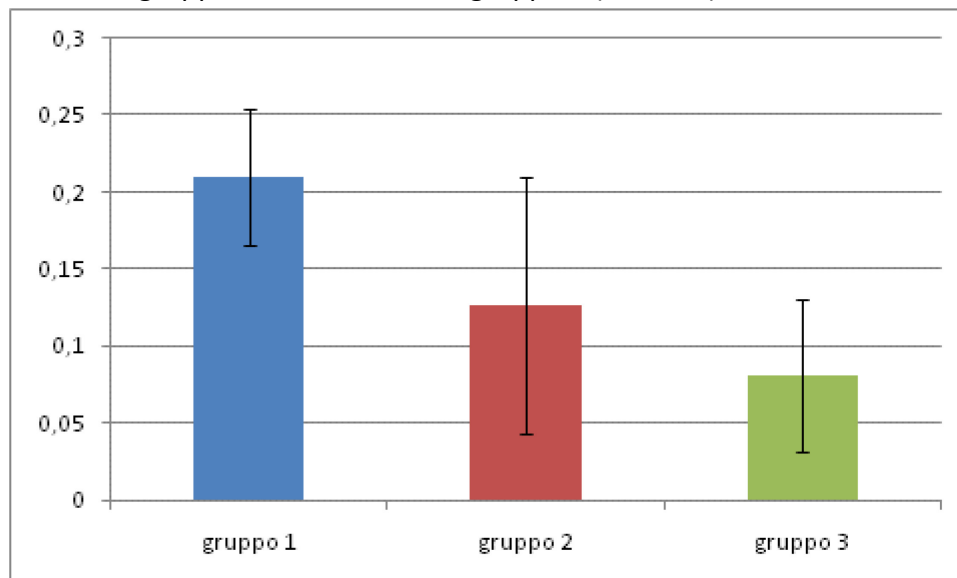


GRAFICO 13. Livelli di motilità progressiva negli spermatozoi dei 3 gruppi di stalloni.

Il grafico 14 raffigura la quantificazione di ATP ottenuta dall'estrazione da 100 milioni di spermatozoi estratti in 250 µl di volume totale. Le concentrazioni di ATP non risultano essere statisticamente differenti tra i diversi gruppi con una concentrazione

di (media \pm DS) 8,08 \pm 4,7 μ M, 14,6 \pm 4,8 μ M e 29,12 \pm 22,8 μ M rispettivamente nei gruppi 1, 2 e 3.

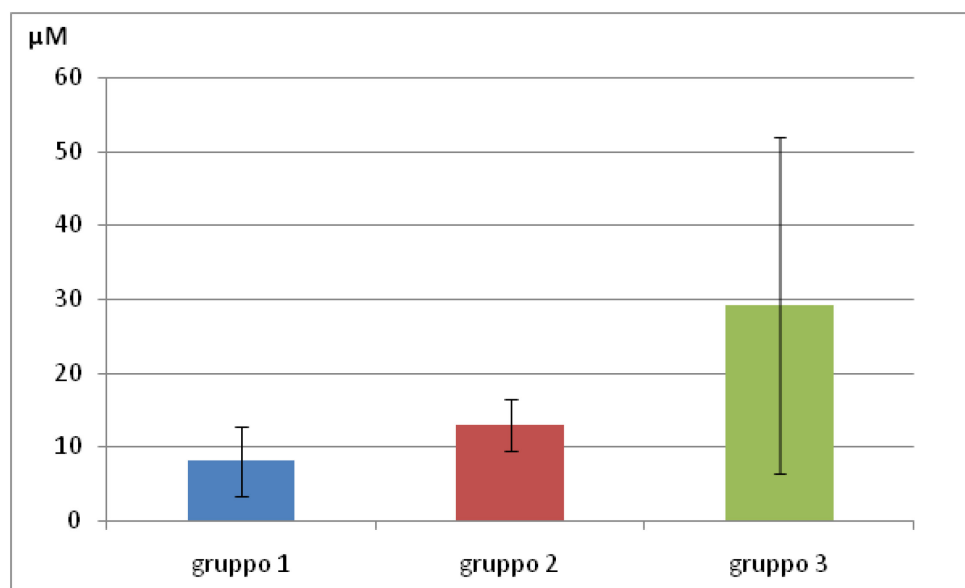


GRAFICO 14. Livelli di ATP negli spermatozoi nei 3 gruppi di stalloni espressi in concentrazione micro molare per 100 milioni di spermatozoi.

6.2. DISCUSSIONE

Molti ritengono che la valutazione del materiale seminale seguendo i vecchi canoni di concentrazione, di mobilità dello spermatozoo siano da affiancare ad altri parametri come quello della disponibilità di energia sotto forma di ATP. L'energia richiesta per l'attività motoria dello spermatozoo deriva dalle scorte intracellulare di ATP e dalla nuova sintesi prodotta dall'attività metabolica dei mitocondri. L'utilizzazione di ATP è regolata dai livelli endogeni dell'AMP ciclico che a sua volta ha anche un effetto diretto sulla motilità spermatica (Madeddu et al, 2010; Succu et al, 2011). Di recente il ruolo dei mitocondri, che dopo la fecondazione, vengono all'interno della cellula uovo eliminati, viene rivisitato ed alcuni sostengono che il loro ruolo sulla motilità spermatica appare molto limitato e la produzione di ATP non è strettamente dipendente dalla loro attività (Amaral et al, 2013). Infatti in condizioni di anaerobiosi gli spermatozoi sopravvivono utilizzando il fruttosio ed il glucosio fino alla produzione di acido lattico e ciò gli permette di rimanere vitali nelle fasi di stoccaggio prima dell'utilizzo per la inseminazione artificiale.

Con sorpresa i dati raccolti in questa sperimentazione non hanno permesso di registrare significative differenze fra i 3 gruppi di stalloni per i parametri considerati,

nonostante le differenze di età fra il gruppo 1 e gruppo 3 risultassero molto ampie e, anche in relazione alle esperienze su altre specie animali, ci si attendevano valori dei parametri qualitativi dell'eiaculato altrettanto differenti. Lo studio, della relazione esistente tra età dell'individuo e qualità dell'eiaculato, è stato effettuato in varie specie animali, in particolare nell'uomo, ma ancora non si conoscono pienamente i fattori coinvolti. Oltre che con il declino dei livelli ormonali che influenzano tutto l'organismo, l'invecchiamento è associato con alterazioni dell'epitelio seminifero e della vascolarizzazione dei testicoli, con conseguente alterazione della produzione spermatica giornaliera (Angelopolou e coll, 2013). L'invecchiamento sembrerebbe indurre modificazioni istologiche nei testicoli e una diminuzione della qualità spermatica, con presenza nelle dellule germinali di strutture vacuolari e un decremento delle cellule spermatiche (Tanemura et al, 1993) e una diminuzione della motilità degli spermatozoi (Wang e coll, 1993). La causa principale della perdita di vitalità da parte dello spermatozoo è dovuta principalmente ad alterazioni della funzionalità dei mitocondri, dovuta per la maggior parte alla produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) che inducono numerose alterazioni a livello di proteine, lipidi e DNA, inficiando la funzionalità mitocondriale e di conseguenza dello spermatozoo (Aitken et al, 2014). La perdita della motilità è stata associata, per esempio, ad una alterazione della funzionalità dello spermatozoo che causa una diminuzione delle concentrazioni di ATP (de Lamirande e Gagnon, 1992). I ROS sono comunque necessari per una corretta conduzione di tutte le reazioni ancora non ben caratterizzate, note con il nome di capacitazione, che permettono allo spermatozoo di completare la preparazione e poter fertilizzare l'ovocita (O'Flaherty et al, 2014). Un marcatore ideale per misurare la corretta funzionalità dello spermatozoo a parità di altre condizioni potrebbe essere quindi la determinazione della concentrazione intracellulare di ATP che, indipendentemente dalla funzionalità positiva o negativa dei ROS e dalle condizioni ossidative di proteine, lipidi e mtDNA, è un indicatore quantitativo della funzionalità dei mitocondri. Numerosi studi hanno mostrato che la funzionalità e l'integrità del mitocondrio declina in funzione dell'età (Shigenaga e coll, 1994) hanno messo in evidenza che mitocondri vecchi sembrerebbero morfologicamente e funzionalmente alterati e producono una maggior quantità di ossidanti e meno ATP. Altri studi tuttavia non confermavano questa ipotesi (Maklashina e Ackrell, 2004) evidenziando in vari tessuti un mix di fattori che contribuiscono alla difesa da ossidanti e radicali liberi che impedirebbe la morte cellulare in seguito ad azione degli antiossidanti. I nostri dati non hanno evidenziato differenze sia nella concentrazione degli spermatozoi che nei parametri funzionali vitalità e motilità in relazione all'età dell'animale, anche se possiamo mettere in

evidenza una notevole variabilità all'interno delle diverse classi, specialmente nei due gruppi più giovani. Anche la determinazione della concentrazione di ATP non ha messo in evidenza differenze statisticamente significative che indica una funzionalità mitocondriale simile nelle tre classi di spermatozoi, suggerendo che l'età dello stallone non influenza la funzionalità dello spermatozoo, come ipotizzato anche da alcuni autori sulla specie umana.

Ci possiamo porre la domanda: un cavallo all'età di 25 anni risulta vecchio? e quindi con tutti i limiti che questa condizione comporta sulla produzione del materiale seminale? Alcuni autori sostengono che è da considerare anziano uno stallone che supera l'età di 10 anni (Stewart e Roser, 1998). Bugno e coll. (2010), analizzando i cromosomi sessuali di spermatozoi raccolti da stalloni anglo-arabi di età compresa fra i 3 ed i 23 anni mediante tecniche di ibridazione in situ, hanno osservato un incremento del numero delle aberrazioni dei cromosomi con l'avanzare dell'età degli animali.

L'invecchiamento molto spesso appare evidente in alcuni tessuti e organi ma al momento il meccanismo dell'invecchiamento appare difficile da identificare e da valutare nella sua completezza, anche in relazione alla specie analizzata. Nella specie umana è stato osservato che il livello dell'inibina, ormone prodotto dalle cellule del Sertoli, si riduce nel corso della vita degli individui determinando, per un meccanismo a feed-back negativo con l'FSH, un incremento della gonadotropina (Tenover et al 1988). Stewart e Roser (1998) lavorando su stalloni di età differente (5 e 20 anni) hanno osservato che il livello dell'inibina subiva un incremento fino ai 5 anni di vita e successivamente non si registrava alcuna riduzione, mantenendosi stabile fino all'età di 20 anni.

Hess e Roser (2001) hanno utilizzato come marker l'Insulin-like Growth Factor (IGF) per verificare lo stato di invecchiamento e la funzionalità testicolare in stalloni con un'età compresa fra 1 ed i 23 anni riscontrando che le IGF aumentano nelle prime fasi di vita e fino ai 5 anni di età. Il livello di queste molecole, contrariamente a quanto registrato nella specie umana, si mantiene stabile fino ai 23 anni per cui non possono essere impiegate come marker per verificare lo stato di invecchiamento e tantomeno la condizione di fertilità degli stalloni. Al termine del loro studio gli autori ammettono l'inconcludenza dei risultati ottenuti sostenendo che gli stalloni non possono essere considerati come degli individui anziani sulla base di questo parametro.

Jones e Berndtson (1986) hanno evidenziato che il numero delle cellule del Sertoli subisce una riduzione; che il rapporto fra spermatidi e cellule del Sertoli incrementa significativamente con l'avanzare dell'età; che la produzione spermatica diminuisce dopo un picco registrato ai 12 anni di età negli stalloni. Tuttavia studi successivi condotti da Johnson et al, (1991), lavorando su 184 stalloni di età compresa fra i 4 ed i

20 anni, non hanno osservato differenze qualitative da un punto di vista istologico sui tubuli seminiferi in relazione all'età ed alla stagione. Il numero delle cellule del Sertoli non subisce alcuna variazione in relazione all'età da 4 ai 20 anni mentre si è osservato una variazione statisticamente significativa in relazione alla stagione dell'anno. Gli autori hanno dimostrato che il peso di entrambi i testicoli, la produzione spermatica giornaliera, il numero delle cellule del Sertoli risultavano essere positivamente correlata con la stagione dell'anno. In particolare nel periodo primaverile si registrano valori staticamente più elevati rispetto alle altre stagioni dell'anno. Gli stalloni che mostravano un'età compresa fra i 12 ed i 20 anni evidenziavano una più elevata produzione spermatica statisticamente significativa rispetto agli stalloni di età di 5 anni, mentre gli stalloni di età compresa fra i 6 ed i 12 anni non mostravano differenze apprezzabili rispetto ai più giovani ed ai più vecchi.

Se procediamo ad una analisi in letteratura sull'argomento ci accorgiamo che pochi sono i dati riguardanti l'effetto dell'età sulla produzione del materiale seminale negli stalloni. Gran parte di questi spesso utilizzano dati di stalloni che vengono adibiti alla monta naturale e che vengono portati successivamente alla macellazione (Jones e Berndtson, 1986). Eppure, la condizione di management degli stalloni impiegati in monta naturale o in stazioni di inseminazione strumentale, riveste un ruolo importante nella potenzialità riproduttiva.

Naturalmente la condizione che caratterizza uno stallone che viene impiegato nella monta naturale appare di gran lunga molto più limitativa rispetto ad uno stallone che invece viene utilizzato nella inseminazione strumentale. Come è noto la cavalla ha una durata del ciclo sessuale non proprio precisa e costante in particolare per quanto riguarda la fase estrale. Pertanto in condizioni di monta naturale si potrebbe verificare che lo stallone potrebbe essere impiegato nell'accoppiamento più volte ed in tempi ravvicinati per garantire una maggiore presenza di spermatozoi capacitati in prossimità dell'ovulazione. Naturalmente se si hanno a disposizione soggetti di una certa età si potrebbe determinare un qualche problema. Se invece lo stallone viene impiegato come donatore di spermatozoi nei programmi di inseminazione strumentale, la gestione anche di soggetti di una certa età potrebbe creare meno problemi, come hanno suggerito Blanchard e coll (2012).

Si può ipotizzare che nei centri di raccolta gli stalloni vengono sottoposti ad un management, di routine di prelievo che certamente appare impossibile realizzare in monta naturale. Ciò potrebbe creare quella situazione particolare di microambiente nel tubulo seminifero tale da garantire costante la replicazione dello spermatogonio in cellula staminale e cellula differenziata assicurando in tal modo una buona e costante

produzione spermatica. Ryu e coll (2006) hanno ipotizzato che l'invecchiamento potesse derivare da una cattiva funzionalità a carico delle cellule staminali.

L'atrofia dei tubuli seminiferi e fenomeni di fibrosi interstiziale sono eventi osservati in stalloni con età di 23-25 anni in percentuali significativamente maggiori rispetto a soggetti di età inferiore (4-20 anni). Gli esami istologici, le immagini derivanti dalla microscopia elettronica ed i dati provenienti dalle analisi di tipo immunoistochimico hanno permesso di osservare una serie di alterazioni di carattere strutturale nei testicoli di cavalli di razza. In particolare si è registrato che la lamina propria, una delle componenti che caratterizzano la costituzione della barriera emato-testicolare, risultava assottigliata, mentre le cellule mioidi, basilari nella contrazione dei tubuli seminiferi e nel trasporto delle cellule spermatiche dalla base verso il lume tubulare (Fukuda et al, 2001), mostravano chiari segni di diminuzione dell'actina e spesso si presentavano come mio fibroblasti, determinando in questo modo la fibrosi testicolare.

La possibilità di predire la capacità fecondante di uno stallone rappresenta uno dei punti più qualificanti nei programmi di selezione della specie equina. La valutazione dei tradizionali parametri come la motilità, la concentrazione etc non appare strettamente correlata alla fertilità (Magistrini et al, 1996).

Molti ritengono che la valutazione del materiale seminale seguendo i vecchi canoni di concentrazione, di mobilità dello spermatozoo siano da affiancare ad altri parametri come quello della disponibilità di energia sotto forma di ATP. L'energia richiesta per l'attività motoria dello spermatozoo deriva dalle scorte intracellulari di ATP e dalla nuova sintesi prodotta dall'attività metabolica dei mitocondri. L'utilizzazione di ATP è regolata dai livelli endogeni dell'AMP ciclico che a sua volta ha anche un effetto diretto sulla motilità spermatica (Madeddu et al, 2010; Succu et al, 2011). Di recente il ruolo dei mitocondri, che dopo la fecondazione vengono all'interno della cellula uovo eliminati, viene rivisitato ed alcuni sostengono che il loro ruolo sulla motilità spermatica appare molto limitato e la produzione di ATP non è strettamente dipendente dalla loro attività (Amaral et al, 2013). Infatti in condizioni di anaerobiosi gli spermatozoi sopravvivono utilizzando il fruttosio ed il glucosio fino alla produzione di acido lattico e ciò gli permette di rimanere vitali nelle fasi di stoccaggio prima dell'utilizzo per la inseminazione artificiale.

6.3. CONCLUSIONI

Dai dati in nostro possesso appare difficile trarre delle conclusioni definitive dell'effetto dell'età sulla qualità del materiale seminale provenienti da stalloni. Tuttavia non possiamo sottrarci dal fare alcune importanti considerazioni.

In primo luogo la capacità di produrre un numero elevato di spermatozoi e di buona qualità si mantiene nella specie equina fino ad una età avanzata. Pertanto forse dobbiamo riconsiderare la valutazione del livello di invecchiamento almeno per gli stalloni. Non abbiamo elementi per stabilire se questo possa rispecchiare una caratteristica tipica della specie equina ed in particolare dello stallone o se invece sia imputabile alle condizioni di management nel quale vengono mantenuti gli animali nelle stazioni di monta e sottoposti al prelievo di materiale seminale. Crediamo che su questo aspetto debbano essere portati avanti ulteriori investigazioni per verificare se anche gli stalloni impiegati nella monta naturale manifestano la stessa risposta.

L'elevata variabilità dei parametri registrati nell'eiaculato sono verosimilmente il risultato dell'ampia differenza di età fra gli stalloni che certamente non ci permettono di avere precise indicazioni sulla condizione degli animali. Se da un lato ciò rappresenta un limite dall'altro potrebbe costituire un potenziale vantaggio in quanto se tale variabilità deriverebbe da una ampia diversità genetica degli stalloni che potrebbe essere oggetto di selezione.

La nostra difficoltà a trarre conclusioni in questa sperimentazione deriva anche da un grosso fattore che ha limitato la nostra sperimentazione e che è determinato dal limitato numero di animali impiegati nella prova. Certamente un nostro futuro obiettivo è di continuare il nostro rapporto di collaborazione con la sezione di ippologia di AGRIS per far crescere il livello di conoscenza sulle caratteristiche biochimico-fisiologiche del materiale seminale.

7. ESPERIMENTO 3: VALUTAZIONE DELLE CONCENTRAZIONI DI ATP E DEL PROTEOMA NEL PLASMA SEMINALE DI STALLONI IPOFERTILI

7.1. SCOPO

L'obiettivo di questo studio era di identificare mediante tecniche elettroforetiche dei fattori presenti nell'eiaculato, spermatozoi o plasma seminale, che potessero essere correlati con la fertilità degli stalloni. Per questo obiettivo sono stati utilizzati gli eiaculati di 12 stalloni, 4 classificati a bassa fertilità in seguito a cicli di inseminazione e fertilizzazione e 8 come controllo. Dagli eiaculati ottenuti mediante utilizzo di vagina artificiale, è stata valutata la concentrazione, la vitalità e la motilità degli spermatozoi per evidenziare eventuali anomalie funzionali degli spermatozoi in relazione al gruppo sperimentale e di ciascun eiaculato sono state valutate: la concentrazione spermatica di ATP negli spermatozoi, direttamente correlata alla motilità, mediante elettroforesi capillare e il pattern proteico dell'eiaculato mediante elettroforesi bidimensionale, in relazione alle varie attività spermatiche regolate durante la capacitazione, il trasferimento fino alla giunzione utero tubarica, la costituzione di una riserva spermatica e la penetrazione degli involucri dell'ovocita.

7.2. MATERIALI E METODI

Elettroforesi bidimensionale

L'elettroforesi bidimensionale è stata eseguita utilizzando l'isoelettrofocalizzazione su gradiente immobilizzato (IPG) nella prima dimensione e la elettroforesi in presenza di SDS nella seconda dimensione.

Il supporto utilizzato nella IPG consisteva di strip di acrilamide prepolimerizzate con un intervallo di pH 3-10 (Biorad, Hercules, CA, USA). 45 µg di proteine sono state diluite in 125 ml di tampone per IPG contenente urea 8M, 2% CHAPS [3-(3-(cholamidopropyl) dimethyl ammonio) -1 propano solfonato], 40 mM ditiotreitolo (DTT), 0,2% anfoline pH 3-10 (Biorad), 0,0002% blu di bromo fenolo, 2 ml di tributil fosfina. Ciascun campione è stato stratificato su una strip, ricoperto di olio minerale per evitare l'evaporazione e lasciato ad incubare a 20°C per 24 ore. Le strip sono state quindi sottoposte ad isoelettrofocalizzazione in un sistema Protean IEF gel (Biorad) a 250V per 4 ore, ramp a 500 V in 4 ore, a 1000V in 4 ore, a 2500 V in 3 ore, a 4000V in 1 ora seguito da uno

step fino a 10000V a 6000V/h. Alla fine della corsa ciascuna strip è stata equilibrata in equilibration buffer 1 contenente 6M urea, , 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glicerolo e 2% DTT per 10 minuti e di seguito per altri 10 minuti in equilibration buffer 2 costituito da 6M urea, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 2% SDS, 20% glicerolo e 2,5% iodoacetamide.

La elettroforesi in SDS su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) è stata eseguita secondo quanto riportato da Laemmli (1970) con qualche modifica. La camera elettroforetica utilizzata era un sistema verticale protean II Biorad. Lo stampo era preparato interponendo tra due vetri, lavati e sgrassati con etanolo, due spaziatori plastici di 1.5 mm di spessore e serrando la base nell'apposita sede. La miscela per il running gel era composta dal 12% di acrilamide/bisacrilamide 29/1, Tris-HCl 0,375 M (pH 8,3), SDS 0,1%, ammonio persolfato 0.067 % e Temed allo 0,05%. Prima dell'aggiunta dell'ammonio persolfato e del Temed, la miscela veniva degasata mediante una pompa a vuoto per 10 minuti, quindi venivano aggiunti i due componenti. La miscela veniva immediatamente versata nello stampo fino a 3,5 cm dal bordo superiore, ricoperta con 2 ml di H₂O deionizzata saturata con N-Butanolo e lasciata polimerizzare per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo la polimerizzazione del running gel veniva aspirato il liquido alla sua superficie mediante una pompa a vuoto e nello spazio residuo veniva posta la strip derivante dalla prima dimensione, sormontata da una soluzione di agarosio Low melting point all'1% in Tris-HCl 25 mM, Glicina 192 mM e blu di bromofenolo 0,1%. Dopo la polimerizzazione il gel veniva assemblato alla camera elettroforetica (Biorad). La camera anodica e catodica erano riempite con il tampone di corsa (Tris-HCl 25 mM; Glicina 192 mM). Ai campioni da analizzare veniva aggiunto un ugual volume di sample buffer (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8), il 4 % di SDS, il 20 % di glicerolo, il 10% di β -mercaptoetanol e lo 0,0025 % di Blu di bromofenolo; venivano poi incubati per 5 minuti a 100°C e lasciati raffreddare a temperatura ambiente, prima di essere depositi sul fondo dei pozzetti, al catodo della camera elettroforetica.

Le condizioni elettriche utilizzate durante la corsa elettroforetica prevedevano un amperaggio costante con 25 mA/gel per il transito nello Stacking gel, e 30 mA/gel per il running gel. La corsa era terminata quando il colorante blu di bromofenolo presente nel sample buffer raggiungeva la fine del gel. La elettroforesi in SDS su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) è stata eseguita secondo quanto riportato da Laemmli (1970) con qualche modifica.

La camera elettroforetica utilizzata era un sistema verticale protean II Biorad. Lo stampo era preparato interponendo tra due vetri, lavati e sgrassati con etanolo, due spaziatori plastici di 1.5 mm di spessore e serrando la base nell'apposita sede. La

miscela per il running gel era composta dal 12% di acrilamide/bisacrilamide 29/1, Tris-HCl 0,375 M (pH 8,3), SDS 0,1%, ammonio persolfato 0.067 % e Temed allo 0,05%. Prima dell'aggiunta dell'ammonio persolfato e del Temed, la miscela veniva degasata mediante una pompa a vuoto per 10 minuti, quindi venivano aggiunti i due componenti. La miscela veniva immediatamente versata nello stampo fino a 3,5 cm dal bordo superiore, ricoperta con 2 ml di H₂O deionizzata saturata con N-Butanolo e lasciata polimerizzare per 1 ora a temperatura ambiente.

Dopo la polimerizzazione del running gel veniva aspirato il liquido alla sua superficie mediante una pompa a vuoto e nello spazio residuo veniva versata la miscela per lo stacking gel, costituita da acrilamide/bisacrilamide (29/1) al 4%, Tris-HCl 0,031 M (pH 6,8), SDS allo 0,1%, ammonio persolfato 0.067 % e Temed allo 0,05%. Veniva aggiunto, alla miscela per lo stacking gel, l'ammonio persolfato e il Temed e veniva quindi versata nello stampo la miscela polimerizzante.

Nella miscela in polimerizzazione veniva inserito uno stampo plastico in modo da formare 15 pozzetti per la deposizione del campione. Lo Stacking gel veniva lasciato polimerizzare per 30 minuti. Dopo la polimerizzazione dello Stacking gel, veniva tolto lo stampo per i pozzetti, e il gel veniva assemblato alla camera elettroforetica (Biorad). La camera anodica e catodica erano riempite con il tampone di corsa (Tris-HCl 25 mM; Glicina 192 mM).

Ai campioni da analizzare veniva aggiunto un ugual volume di sample buffer (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8), il 4 % di SDS, il 20 % di glicerolo, il 10% di beta-mercaptoetanol e lo 0,0025 % di Blu di bromofenolo; venivano poi incubati per 5 minuti a 100°C e lasciati raffreddare a temperatura ambiente, prima di essere depositi sul fondo dei pozzetti, al catodo della camera elettroforetica.

Le condizioni elettriche utilizzate durante la corsa elettroforetica prevedevano un amperaggio costante con 25 mA/gel per il transito nello Stacking gel, e 30 mA/gel per il running gel. La corsa era terminata quando il colorante blu di bromofenolo presente nel sample buffer raggiungeva la fine del gel.

7.3. RISULTATI

Nel grafico 15 sono riassunti i dati relativi al livello di concentrazione spermatica nei 2 gruppi di stalloni. Dall'esame dei dati si osserva che non esistono differenze statisticamente significative ($P= 0,62$). Gli eiaculati degli stalloni del gruppo controllo presentavano infatti una concentrazione di $349,8 \pm 274,9$ milioni di spermatozoi/ml (media \pm DS) mentre quella del gruppo degli ipofertili era di $230,7 \pm 224,9$ milioni/ml.

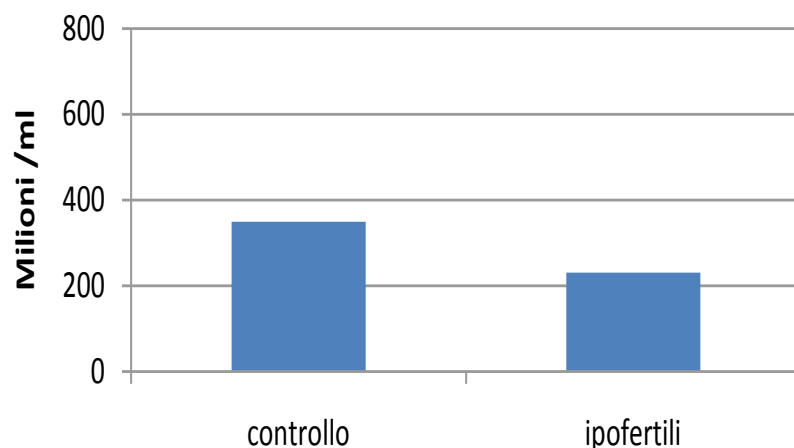


GRAFICO 15. Concentrazione media degli spermatozoi negli eiaculati di cavalli normali e ipofertili.

Nel grafico 16 vengono riportati i dati relativi alla vitalità degli spermatozoi effettuata mediante Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA).

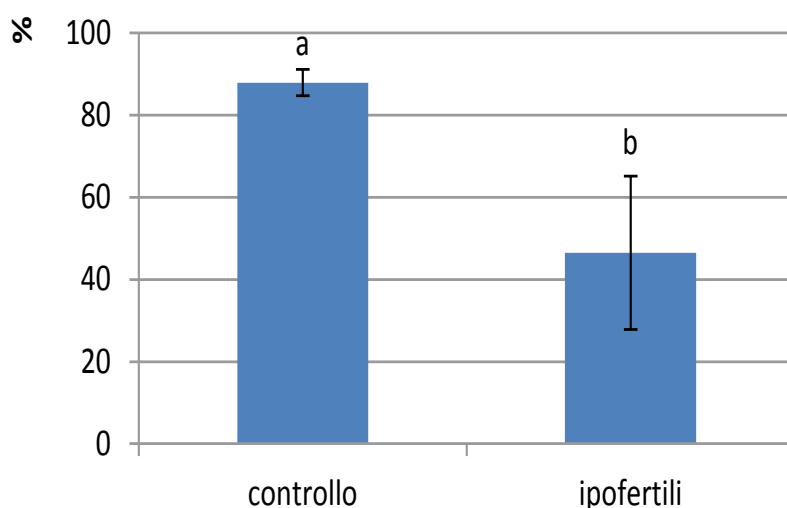


GRAFICO 16. Vitalità media degli spermatozoi negli eiaculati di cavalli normali e ipofertili (ANOVA: a vs $b = p < 0,01$)

Come si può osservare il gruppo controllo esprime una vitalità statisticamente maggiore ($P < 0,01$) rispetto al gruppo degli ipofertili. Infatti le percentuali di spermatozoi vitali era (media \pm DS) $87,9 \pm 3,21\%$ e $46,50 \pm 18,65\%$ rispettivamente. Nel grafico 3 sono mostrati i valori di motilità progressiva in relazione agli spermatozoi presenti negli eiaculati dei 2 gruppi di stalloni. I valori ottenuti si differenziano significativamente con rapporti di (media \pm DS) $0,20 \pm 0,04$ nel gruppo controllo e $0,08 \pm 0,05$ nel gruppo degli ipofertili ($P < 0,05$).

Il grafico 17 raffigura la quantificazione di ATP ottenuta da 100 milioni di spermatozoi estratti in 250 μ l di volume totale. Le concentrazioni di ATP non risultano essere statisticamente differenti tra i diversi gruppi con una concentrazione di (media \pm DS) 5,32 \pm 0,92 μ M nel gruppo controllo e 5,85 \pm 0,96 μ M nel gruppo degli ipofertili.

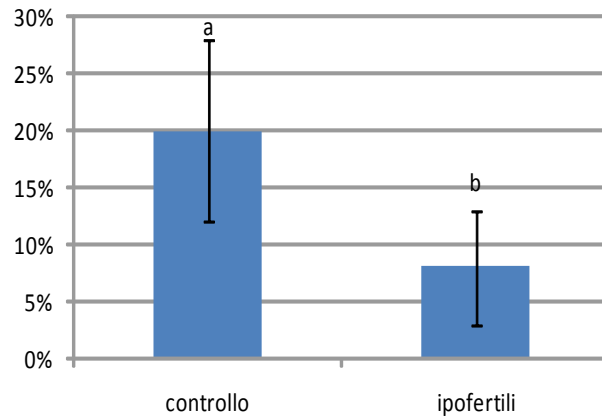


GRAFICO 17. Motilità progressiva degli spermatozoi negli eiaculati di cavalli normali e ipofertili (ANOVA: a vs b = $p < 0,05$)

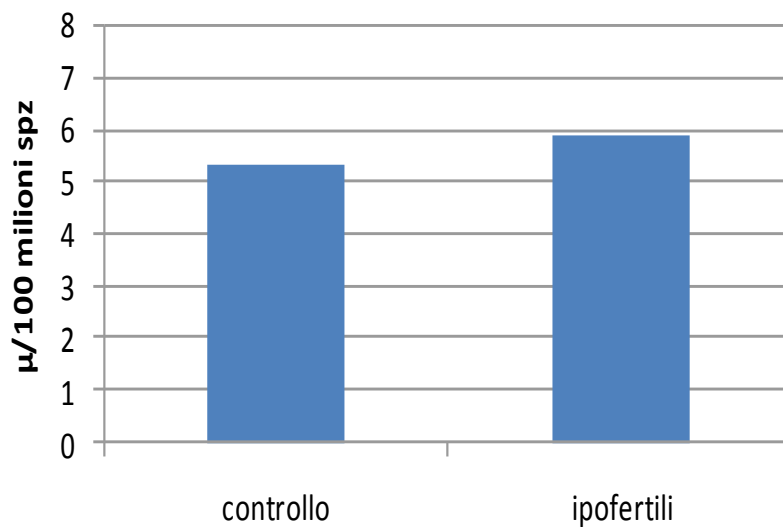


GRAFICO 18. Concentrazione di ATP in spermatozoi di cavalli controllo e ipofertili (ANOVA: ns).

Nella Fig. 13 è mostrato il Master gel ottenuto dopo analisi dei gels elettroforetici ottenuti dall'elettroforesi bidimensionale.

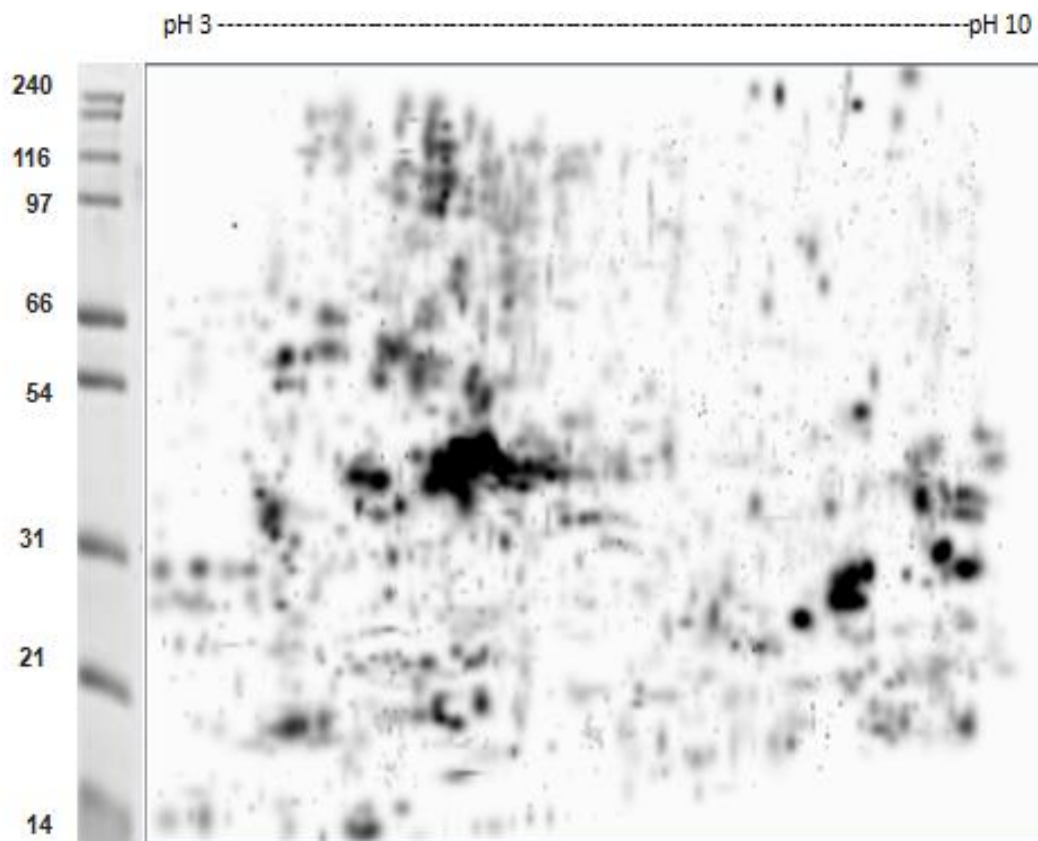


Figura 13. Master gel ottenuto mediante analisi d'immagine confrontando tutti i gel elettroforetici del plasma seminale di stalloni ipofertili e controllo.

Dai dati elaborati è risultato che stalloni del gruppo ipofertili posseggono una diversa espressione a carico di alcuni spot proteici nei gel 2D SDS-PAGE rispetto a stalloni controllo. Sono stati evidenziati 126 spot espressi diversamente tra i due gruppi e tra questi 4 spot erano assenti nei gels elettroforetici delle proteine di plasma seminale di stalloni ipofertili (Fig. 14) mentre 11 spots erano espressi negli ipofertili e assenti in quelli dei cavalli controllo (Fig. 15).

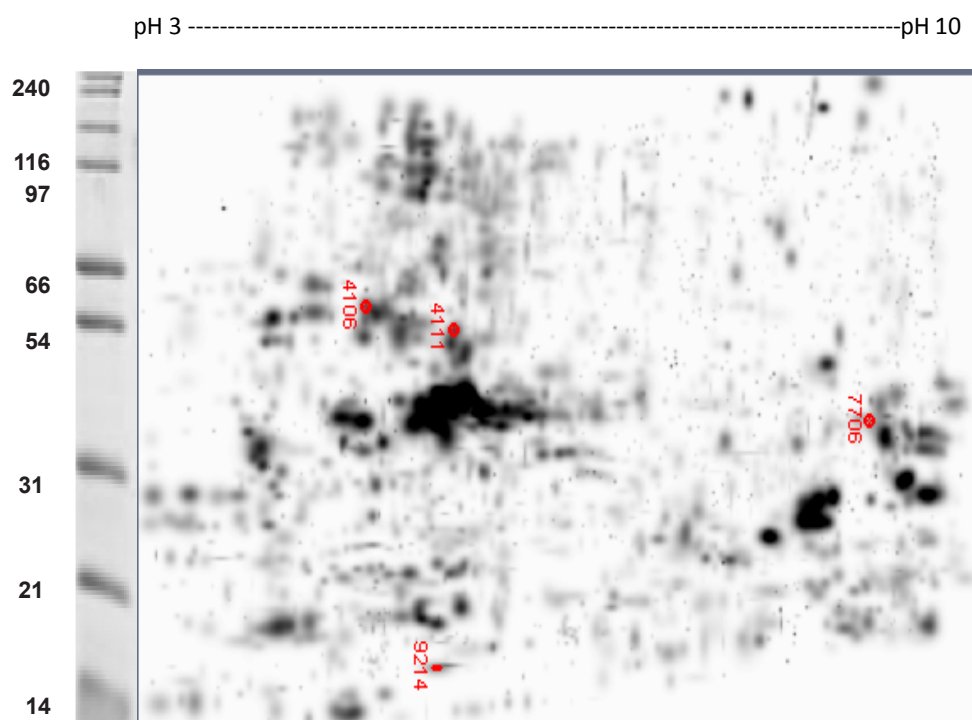


Figura 14. Rappresentazione master dei 4 spot proteici individuati nel gel elettroforetici del plasma seminale di stalloni controllo ma assenti in quelli ipofertili.

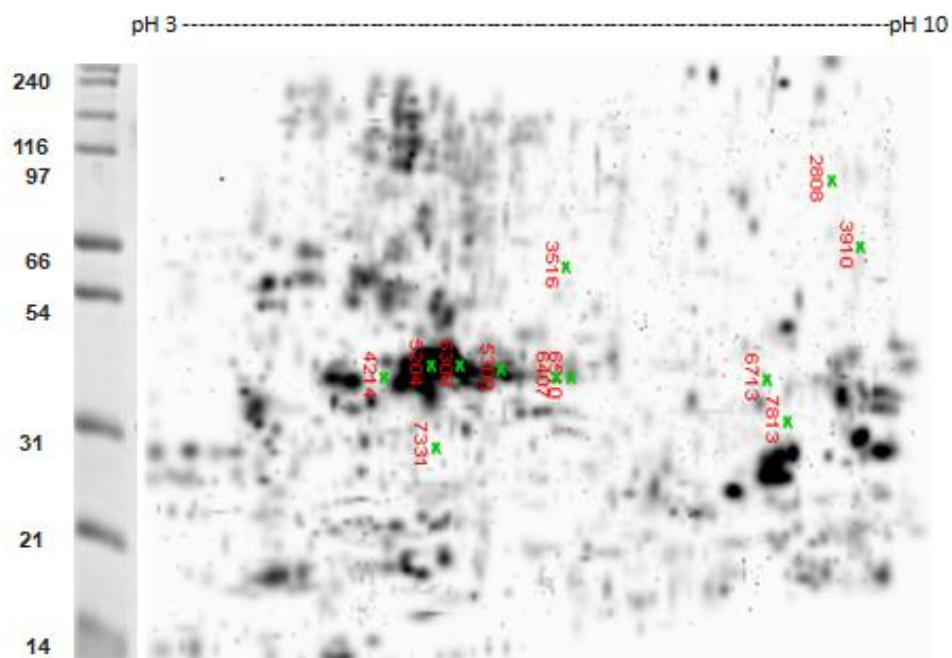


Figura 15. Rappresentazione master degli 11 spot proteici individuati nel gel elettroforetici del plasma seminale di stalloni ipofertili ma assenti in quelli controllo.

7.4. DISCUSSIONE

La motilità spermatica indica la capacità dello spermatozoo di spostarsi verso l'ovocita per permetterne la fecondazione. La motilità progressiva è definita come la velocità con moto attivo, sia lineare che in grandi cerchi, essenziale per lo spermatozoo per il passaggio attraverso il muco cervicale o per attraversare la zona pellucida sia in vivo che in vitro (Bjorndahl, 2010), per cui la valutazione della motilità progressiva è considerata come uno dei principali parametri per la determinazione della capacità fecondante del seme (Donnelly et al, 1998; Turner, 2003). La percentuale di spermatozoi con una determinata velocità lineare e progressiva è un indicatore della capacità fecondante del seme. L'attivazione del movimento del flagello dello spermatozoo inizia subito dopo che questo lascia l'epididimo e rappresenta uno dei primi eventi nelle multiple modificazioni biochimiche e fisiologiche che accompagnano la capacitazione spermatica (Eliasson, 2010; Breitbart e Naor, 1999).

La motilità spermatica è dovuta alla spinta del flagello, una struttura tubulare che mediante il suo movimento imprime una spinta alla cellula spermatica, permettendogli di progredire nello spazio. La motilità flagellare richiede l'attivazione degli apparati flagellari e del metabolismo energetico. Il moto flagellare è infatti generato dall'attività motrice della dineina dell'assonema del flagello ad attività ATPasica, localizzata lungo tutta la lunghezza del flagello, che è dipendente dal costante apporto di ATP (Turner, 2003) per cui la motilità è strettamente correlata alla attività dei mitocondri e alla capacità dello spermatozoo di modulare il suo stato energetico (Volpe et al, 2009). La valutazione quantitativa dell'ATP effettuata mediante elettroforesi capillare non ha evidenziato differenze tra le concentrazioni di questa molecola negli spermatozoi dei due gruppi sperimentali, suggerendo che la concentrazione dell'ATP non è il fattore limitante nel determinare la minore motilità degli spermatozoi degli stalloni ipofertili.

Mentre fino a poco tempo fa il plasma seminale era visto come un mero veicolo per il trasporto degli spermatozoi, spesso deleterio nell'applicazione di alcune biotecnologie riproduttive, negli ultimi anni è stata data notevole importanza alle componenti del plasma seminale quali determinanti la capacità degli spermatozoi di arrivare fino alla giunzione utero-tubarica e penetrare l'ovocita maturo. Numerose evidenze hanno dimostrato altri ruoli del plasma seminale, per esempio nella modulazione delle funzioni spermatiche, nella capacità di interazione con gli epiteli e le secrezioni del tratto genitale femminile e anche come un messaggero molecolare per la femmina, col sistema immunitario in particolare (Rodriguez-Martinez et al, 2008, 2009, 2010). Componenti semplici del plasma seminale sembrano giocare un ruolo importante per la vitalità spermatica. Per esempio il bicarbonato destabilizza il plasma lemma durante

il processo di capacitazione (Rodriguez-Martinez et al, 2005) mentre lo zinco modula la stabilità della cromatina (Bjorndahl et al, 2010). La maggior parte dei peptide e delle proteine del plasma seminale giocano altri ruoli, che generalmente sono altamente conservati, tra i quali, oltre che regolare la capacitazione dello spermatozoo, l'ausilio della formazione di una riserva spermatica nell'ovidotto in attesa dell'ovocita da fecondare, l'interazione con l'ovocita e la sua fusione (Topfer-Petersen et al, 2005) e la sua interazione con altri tipi cellulari durante il percorso, sono implicati anche nella pulizia da eventuali patogeni e nei rapporti con l'organismo femminile come la modulazione di risposte immunologiche femminili o l'immunotolleranza verso gli spermatozoi, gli embrioni o i tessuti feto-placentali, tutte componenti essenziali per il successo riproduttivo (Robertson, 2010). L'elettroforesi bidimensionale ci ha permesso di mettere in evidenza 126 proteine differentemente espresse dal punto di vista quantitativo ma soprattutto delle differenze dal punto di vista qualitativo. Quattro proteine presenti nel plasma seminale di individui normali erano assenti in quello degli ipofertili mentre questi ultimi presentavano 12 proteine assenti nel proteoma del plasma seminale di individui controllo. È stato precedentemente riportato nei bovini (Killian et al, 1993) l'associazione tra 4 proteine presenti nel plasma seminale e la fertilità nei bovini; due di queste proteine 26kDa (pI 6.2) e 55kDa (pI 4.5) , identificate in seguito come prostaglandina G sintasi (Gerena et al, 1998) e osteopontina (Cancel et al,1997) e erano presenti nel plasma seminale di tori ad alta fertilità, mentre altre due, 16kDa (pI 4.1) e 16kDa (pI 6.2) sono state evidenziate in tori a bassa fertilità. Da studi successivi condotti sempre nel bovino sono state identificate numerose altre proteine presenti nel plasma seminale e associate a vari stadi della fertilizzazione (Desnoyers e Manjunath 1992; Töpfer-Petersen, 1999; Gwathmey et al, 2013). In relazione alle loro caratteristiche strutturali la maggior parte di queste proteine sono state classificate come Fibronectine, proteine secretorie ricche in cisteina (CRISP) e spermadesine (Töpfer-Petersen et al,2005).

Comunque le funzioni dei vari componenti proteici nel plasma seminale non sono ancora chiare. Fattori di antifertilità nel plasma seminale sono stati descritti per numerose specie e includono, ma non sono limitati a questi, fattori di decapacitazione (Reyes et al, 1975), il fattore 1 di antifertilità nell'uomo (Reddy et al, 1982; Audhya et al, 1987), il fattore stabilizzante l'acrosoma nel coniglio (Eng e Oliphant, 1978), e la plasmina seminale nel bovino (Shivaji et al, 1984). Questi fattori inibiscono la capacitazione spermatica, la reazione acrosomiale e l'attività di enzimi acrosomiali prima della fertilizzazione. Al contrario diversi fattori proteici sono stati descritti come promotori della vitalità spermatica e della fertilizzazione. Questi includono le heparin binding proteins nel plasma seminale di bovino e suino (Sanz et al, 1993; Miller et al,

1990; Audhya et al, 1987), un complesso proteico che induce iperattivazione nello spermatozoo (Aumuller et al, 1988) e le spermoadesine nel maiale, una classe di proteine che è stato postulato abbiano un ruolo importante nell'interazione tra spermatozoo e ovocita e nella capacitazione spermatica (Sanz et al, 1993). I dati ottenuti dalle nostre sperimentazioni sembrano confermare la presenza di proteine associate con la fertilità, corrispondenti alle quattro proteine assenti nel gel elettroforetico degli stalloni ipofertili rispetto a quelli controllo, di cui una potrebbe corrispondere all'osteopontina (n°4106: 55kDa - pI 4.5). La presenza di 11 proteine espresse solamente nel plasma seminale di stalloni ipofertili suggerisce che questi polipeptidi possono essere i promotori di un effetto antifertilità oppure essere marcatori molecolari di stalloni a bassa fertilità (Brandon et al, 1999).

La capacità di valutare la fertilità dello stallone utilizzando un saggio per determinare cambiamenti quantitativi nelle proteine del plasma seminale potrebbe essere estremamente vantaggioso per veterinari e allevatori di cavalli. L'elettroforesi delle proteine del plasma seminale potrebbe essere lo strumento per mappare e identificare proteine solubili componenti dell'eiaculato di diverse specie di mammifero (Autiero et al, 1991) e questo approccio ha già permesso (Amman, 1987) di correlare la presenza di proteine specifiche del plasma seminale di equino e la motilità post scongelamento degli spermatozoi.

La differenza delle proteine da noi evidenziate nel plasma seminale di individui ipofertili rispetto ad individui controllo potrebbe essere dovuta anche a una modulazione ormone dipendente. I quattro stalloni ipofertili studiati sono infatti animali relativamente giovani, essendo nati tra il 2006 e il 2008, per cui si potrebbe ipotizzare una incompleta maturazione sessuale, con la produzione di androgeni a livelli non ancora ottimali. È stata infatti dimostrata l'influenza di questi ormoni anche sulla costituzione molecolare del plasma seminale.

McDowell et al (1996), nella caratterizzazione dei profili proteici del plasma seminale di stalloni e cavalli castrati, trattati o meno con testosterone hanno messo in evidenza la presenza di due gruppi di proteine differenzialmente espresse presenti solamente in concomitanza col trattamento con testosterone, che indicano dipendenza da androgeni per la loro sintesi e/o secrezione nel plasma seminale. Per contro tre gruppi di proteine erano maggiormente espresse negli stalloni castrati non trattati con progesterone indicando una loro sintesi/secrezione androgeno indipendente.

7.5. CONCLUSIONI

In conclusione i nostri dati hanno dimostrato che l'analisi elettroforetica è uno strumento utile per la determinazione di fattori presenti nel plasma seminale di stallone che sono implicati nella regolazione della sua fertilità. L'applicazione di questa tecnica ha infatti permesso di individuare un pattern proteico caratteristico di stalloni con un basso indice riproduttivo che potrebbe essere utilizzato a priori per la valutazione della capacità fecondante del seme in vivo. Dai nostri studi è stato evidenziato che la variazione di motilità degli spermatozoi di individui ipofertili non può essere messa in relazione con la quantità di ATP presente nello spermatozoo, ma piuttosto con la costituzione molecolare del plasma seminale, che non influenza la quantità di spermatozoi presenti nell'eiaculato ma, piuttosto la loro funzionalità. Ulteriori studi di spettrometria di massa volti alla caratterizzazione delle molecole differenzialmente espresse sono necessari, e saranno il prossimo passo sperimentale, per poterle mettere in relazione con la funzione svolta ed individuare una molecola marcatore di fertilità, da poter essere utilizzata nella progettazione di un saggio di fertilità da utilizzare nelle procedure di fecondazione assistita nel cavallo.

8. ESPERIMENTO 4: DETERMINAZIONE DI FATTORI MOLECOLARI CORRELATI ALLA COMPETENZA ALLO SVILUPPO DELL'OOCITA DI OVINO.

La qualità dell'oocita è ritenuta il fattore limitante nella fertilità femminile, ed è riferita al suo intrinseco potenziale di sviluppo. Dipende dallo stato biochimico e molecolare che permette all'oocita maturo di essere fertilizzato e sviluppare un embrione che, dopo trasferimento, sarà capace di un corretto sviluppo a termine. In accordo con tutto ciò, una cattiva qualità dell'oocita ha come risultato aneuploidia, disordini epigenetici, arresto dello sviluppo embrionale e aborti spontanei (Gardner and Lane, 2005; Urrego et al, 2014).

Una delle grandi sfide tutt'ora in piedi, nel campo della biologia riproduttiva e nella medicina, è di riuscire a capire la natura dei processi molecolari e cellulari che controllano la qualità dell'oocita. Il processo mediante il quale l'oocita di mammifero acquisisce la competenza allo sviluppo coinvolge eventi complessi e distinti sia della maturazione nucleare che citoplasmatica. La maturazione nucleare implica principalmente la rottura della vescicola germinale (GVBD), la condensazione cromosomica (Metafase I, MI), la segregazione in due nuclei figli e l'estrusione del primo globulo polare (Metafase II, MII). La maturazione citoplasmatica implica la riorganizzazione degli organelli, l'aumento del contenuto delle riserve di calcio e la conservazione di molecole che agiscono in tutti i processi della maturazione, fertilizzazione e nei primi stadi embriogenetici (Ferreira et al, 2009). Il test più appropriato per determinare la qualità dell'oocita è il trasferimento in vivo dell'embrione ottenuto, con la conseguente gestazione, nascita e la successiva integrità del risultante neonato. Ovviamente problemi etici nelle tecnologie riproduttive applicate agli umani restringono questo approccio sperimentale a modelli animali. Inoltre questi esperimenti richiedono un notevole sforzo economico e temporale per arrivare a questi risultati e richiedono un elevato numero di animali per ottenere un quantitativo di dati valutabile statisticamente. Ne consegue che devono essere utilizzati altri parametri per poter valutare la qualità dell'oocita. Criteri che sono solitamente utilizzati per questo scopo includono il successo della maturazione nucleare e le percentuali di MII ottenute, le percentuali di fertilizzazione, la cinetica di sviluppo embrionale, lo sviluppo fino allo stadio di blastocisti, il numero totale di cellule della blastocisti, il numero cellulare del nodo embrionario e del trofoectoderma, il metabolismo dell'oocita e dell'embrione, il contenuto finale di ATP,

lo stoccaggio di mRNA e proteine e l'attività e la distribuzione mitocondriale. L'analisi di tutti questi parametri potrà dare un valido aiuto nello studio dei complessi meccanismi che agiscono con sincronia per determinare la qualità dell'ocita. La maturazione citoplasmatica è associata con un incremento considerevole dello stoccaggio di nutrienti e macromolecole informazionali come gli mRNA, fattori di trascrizione e proteine. Durante la maturazione l'ocita è sottoposto a una redistribuzione spaziale degli organelli citoplasmatici che è funzionale all'acquisizione della competenza meiotica che in ultima analisi influenza le proprietà biologiche di base del futuro embrione (Ferreira et al, 2009; Dumollard et al, 2007).

Numerosi studi mostrano il ruolo del mitocondrio come fattore basilare nel determinare la competenza allo sviluppo per oociti di mammifero, grazie alla loro funzione di fornitori di energia (Van Blerkom et al, 2011).

La quantità e lo stato funzionale dei mitocondri contribuisce alla qualità dell'ocita e gioca un ruolo importante nella fertilizzazione e nello sviluppo embrionale (Santos et al, 2006). In particolare, è stato messo in evidenza che l'ATP sintetizzato dai mitocondri è cruciale per la sintesi proteica e per la fosforilazione, che rappresentano due fondamentali richieste per la maturazione dell'ocita (Stojkovic et al, 2001). Una ridotta efficienza della respirazione mitocondriale e un ridotto contenuto di ATP nell'ocita è stato mostrato essere correlata a un alterato sviluppo embrionale (Stojkovic et al, 2001; Wilding et al, 2001; Nagano et al, 2006).

È stato inoltre postulato che la cinetica del ciclo potrebbe essere utilizzata come un indicatore di qualità sia di oociti che di embrioni. La cinetica della prima divisione meiotica è stata messa in relazione alla qualità della blastocisti in numerose specie (uomo: Dal Canto et al, 2012; suino: Dang-Nguyen et al, 2010; bovino: Somfai et al, 2010; ovino: Leoni et al, 2007). Dominko and First (1997) sono stati i primi che hanno messo in relazione la cinetica della MII alla percentuale di prima divisione e di blastocisti ottenute, mentre la velocità della progressione meiotica è considerata un marcatore di qualità dell'ocita (Escrich et al, 2012). Sono comunque scarse le informazioni sui fattori che influenzano la cinetica del ciclo meiotico negli oociti di mammifero.

L'analisi comparativa degli oociti, con alta e bassa capacità di sviluppo, è essenziale per stabilire dei criteri che possano indicare importanti meccanismi coinvolti nell'acquisizione della competenza allo sviluppo. L'origine follicolare dell'ocita ha un impatto significativo sul suo potenziale di sviluppo e sembrerebbe che una volta che l'ocita è rimosso dal suo follicolo il suo intrinseco potenziale di sviluppo sia stato già determinato (Lonergan and Fair, 2008). Nonostante numerosi studi abbiano riportato la produzione in vitro di embrioni e la nascita di neonati vivi da oociti di animali

prepuberi, la competenza allo sviluppo di oociti di prepubere maturati in vitro è bassa rispetto a quella di oociti derivati da animali adulti (Morton, 2008). Oociti di ovini prepuberi presentano alcune limitazioni funzionali e strutturali rispetto a quelli di adulto, che sono alla base della loro ridotta competenza allo sviluppo (O'Brien et al, 1996; Ledda et al, 1996; Ledda et al, 1997; Ptak et al, 1999; Ptak et al, 2006; Leoni et al, 2007; Bebbere et al, 2009; Ledda et al, 1998).

8.1. SCOPO

Lo scopo di questa sperimentazione era quella di verificare se il potenziale di sviluppo dell'oocita potesse essere messo in relazione alla velocità di progressione meiotica e all'attività mitocondriale, utilizzando come modello sperimentale di bassa competenza allo sviluppo dell'oocita di ovino prepubere e quello di adulto come modello di elevata competenza. Per questo scopo abbiamo comparato la cinetica di maturazione meiotica dopo incorporazione in un sistema di maturazione in vitro, l'attività di produzione di ATP per la valutazione dell'attività mitocondriale durante il ciclo meiotico e le fluttuazioni del pattern proteico dopo elettroforesi bidimensionale di oociti prelevati a differenti tempi di maturazione in vitro.

8.2. MATERIALI E METODI

Oociti di ovino prepubere (30-40 giorni di età) e adulto (4-6 anni di età) sono stati recuperati da ovaie di animali regolarmente macellati e su questi sono stati condotti i seguenti esperimenti:

Determinazione della competenza meiotica e della competenza allo sviluppo: oociti di ovino adulto e prepubere sono stati utilizzati in un sistema di produzione in vitro per poter comparare la loro competenza meiotica e allo sviluppo, mediante determinazione delle percentuali di maturazione e fertilizzazione, la cinetica embrionale e la quantità totale di blastocisti prodotte.

Valutazione della cinetica di progressione meiotica: la cinetica della progressione meiotica è considerata un marcatore di qualità dell'oocita (Escrich et al, 2012), per cui abbiamo paragonato la progressione della maturazione meiotica di oociti di prepubere o adulto a differenti tempi di maturazione. La valutazione della transizione tra GV e MI è stata valutata dopo 6,7,8 e 9 ore di coltura in vitro; la transizione da MI a MII è stata valutata dopo 19,20,21 e 22 ore di coltura in vitro. A ciascun tempo sono stati prelevati

dal sistema di maturazione, in tre replicati, almeno 20 oociti di prepubere e adulto, e processati per la colorazione del nucleo.

Determinazione elettroforetica del pattern proteico durante la meiosi: è stato proposto che la sintesi proteica e la secrezione sono messi in relazione alla competenza di oociti di mammifero (Earl et al, 1998). Abbiamo comparato i patterns proteici elettroforetici di oociti di ovino prepubere e adulto a differenti punti temporali durante la maturazione in vitro. I tempi utilizzati erano quelli in concomitanza con le transizioni tra gli stadi meiotici e sono stati utilizzati solo oociti di uno stadio meiotico ben determinato: stadio di GV a 0 ore; stadio di MI a 7 ore, stadio di MII a 19 e 24 ore. A ciascun tempo sono stati prelevati 20 oociti dai due sistemi di maturazione e sono stati processati per l'elettroforesi bidimensionale.

Quantificazione del contenuto di ATP intracellulare: i livelli energetici dell'oocita sono stati indicati come marcatori utili della sua qualità poiché un incremento di ATP durante la maturazione è richiesto per la successiva fertilizzazione e lo sviluppo embrionale (Stojkovic et al, 2001; Van Blerkom et al, 1995; Van Blerkom, 2011). Le analisi quantitative dell'ATP intracellulare sono state effettuate negli stessi tempi di maturazione utilizzati per la sintesi proteica. A ciascun tempo 20 oociti sono stati prelevati dal sistema di maturazione e processati per la determinazione del contenuto intracellulare di ATP.

Valutazione della cinetica della progressione meiotica

Le ovaie recuperate al mattatoio sono state utilizzate per il prelievo degli oociti mediante apertura dei follicoli in medium TCM199 cui sono stati aggiunti HEPES a concentrazione 25 mmol, penicillina 0.1 g/L, streptomina 0.1 g/L e alcool polivinilico (PVA) allo 0.1% (w/v). I complessi cumulo oocita sono stati selezionati per gli strati delle cellule della granulosa, l'uniformità del citoplasma, l'omogenea distribuzione delle gocce lipidiche nel citoplasma e un diametro intorno ai 90 µm e sono stati maturati in vitro in TCM199 supplementato con siero di pecora in estro decomplesato (OSS) al 10%, 1 IU/mL di FSH/LH e 100 µM cisteamina. 40-45 COCs sono stati aggiunti a 500 µL di medium di maturazione in piastre a 4 pozzetti NUNC (Nunclon, Nalge Nunc International, Danimarca), stratificati con 300 µL di olio mirerale e coltivati per 24 ore in atmosfera al 5% CO₂ a 39°C. Per la determinazione della cinetica di maturazione abbiamo valutato i passaggi di stadio nucleare durante la coltura in vitro determinando degli intervalli di tempo ai quali avviene fisiologicamente il passaggio sia tra GV e MI, tra 6 e 9 ore, e tra MI e MII, tra 19 e 22 ore, oltre ai punti di partenza in GV a 0 ore e di fine maturazione di MII a 24 ore di coltura. Gli oociti sono

stati prelevati a ciascuna ora e de cumulati mediante pipette di vetro del diametro dell'ocita, fissati in metanolo e colorati per 15 minuti in Hoechst 33342 10µg/mL in metanolo ghiacciato. Gli oociti colorati sono stati inglobati in una piccola goccia di glicerolo, montati in un vetrino da microscopia ed esaminati sotto un microscopio a epifluorescenza (Nikon Diaphot, Japan).

Determinazione del pattern proteico durante la meiosi mediante elettroforesi

bidimensionale.

I complessi cumulo oocita sottoposti a maturazione in vitro come descritto precedentemente, recuperati dal sistema di coltura a differenti tempi (0, 7, 19 e 24 ore di maturazione) sono stati denudati dalle cellule del cumulo ooforo mediante pipettamento, con un pipette in vetro, messi in PBS, congelati immediatamente in azoto liquido e congelati a -80°C fino al momento dell'analisi. Allo scongelamento gli oociti (n=20 per ciascun tempo e gruppo sperimentale) sono stati diluiti in 300 µl di buffer di reidratazione (8M urea, 4% CHAPS, 20 mg/ml DTT, 2% pharmalytes, e tracce di blu di bromofenolo) e utilizzati per reidratare una strip per isoelettrofocalizzazione, IEF Immobiline Dry Strip con un gradiente lineare di pH 3-10 (Biorad, Hercules, CA, USA) per 12 ore a 20°C. L'isoelettrofocalizzazione (IEF) è stata effettuata utilizzando una camera Protean IEF Cell (Biorad) con un programma di corsa costituito da 500 V per 1,000 Vhr, 1,000V per 2,000 Vhr, and 8,000V per 22,000 Vhr. Dopo l'IEF le strips sono state incubate in buffer di equilibratura 1 (50mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M urea, 30% glicerolo, 2% SDS, 100 mg/ml DTT e tracce di blu di bromofenolo) per 15 minuti e successivamente in buffer di equilibratura 2 (50mM Tris-HCl, pH 8.8, 6M urea, 30% glicerolo, 2% SDS, 450 mg/ml iodoacetammide e tracce di blu di bromofenolo) per 10 minuti, le strips sono state quindi trasferite su un gel di poliacrilammide al 12% e sigillate con agarosio low melting point allo 0,5% (w/v) prima di essere sottoposto ad elettroforesi in SDS (SDS-PAGE). La SDS-PAGE veniva eseguita a 15°C in una camera termostata Protean II (Biorad), finchè il blu di bromo fenolo non raggiungeva la fine del gel. Dopo l'elettroforesi, i gels sono stati colorati mediante impregnazione argentea (SilverQuest staining kit, Invitrogen, USA) ed essiccati (Biorad Gel dryer). Le differenze tra i gels sono state analizzate mediante il software PDQuest (Biorad).

Quantificazione del contenuto di ATP intracellulare mediante elettroforesi capillare in fluorescenza.

L'ATP è stato quantificato utilizzando il protocollo di Zinellu e coll. (2010). Dopo essere stati pescati dal medium di maturazione a differenti ore di coltura e de cumulati, gli oociti sono stati selezionati per lo stadio meiotico mediante visualizzazione sotto uno stereomicroscopio (Olimpus) a magnificazione 20x. Sono stati selezionati GV (assenza di globulo polare) a 0 ore, MI (presenza di un globulo polare) a 7 ore, MII (presenza di due globuli polari) a 19 e 22 ore di maturazione. Per ciascun tempo 20 oociti in 5 µl di PBS sono stati miscelati con 0.6 mol/L acido perclorico ed incubati per 15 minuti a temperature ambiente prima di essere centrifugati a 10000 rpm per 3 minuti in una centrifuga Eppendorf Microfuge (Eppendorf, Hamburg, Germany). Il surnatante è stato neutralizzato con 1,5 µL di 3.5 mol/L K₂CO₃ e sottoposto a reazione di derivatizzazione prima della corsa elettroforetica. 10 µl di campione o di standard sono stati miscelati con 40 µL di 1.8 mol/L 1-ethyl-3-(3'-N,N'-dimethyl-aminopropyl)-carbodiimide hydrochloride (in 50 mmol/L HEPES buffer, pH 6.5) e 5 µL di 27 mmol/L Bodipy FL EDA (in 50 mmol/L HEPES buffer, pH 6.5) e incubato per 25 ore a 37°C al buio. Per la separazione dell'ATP derivatizzato è stata utilizzato un sistema di elettroforesi capillare P/ACE 5510 CE munito di un sistema di rivelazione a Fluorescenza indotta da laser (Beckman instruments, CA, USA) equipaggiato con un capillare di silice di 50 cm di lunghezza effettiva e 75 µm di diametro interno. L'analisi è stata eseguita a 40°C applicando a 21 nl di campione mediante una pressione di azoto di 0,5 psi per 3 sec in sodio fosfato 10 mmol/L a pH 11.4. Le condizioni elettriche di separazione erano di 22kV in polarità normale venivano raggiunte in 20 sec e tenute con un voltaggio costante per 8 minuti.

Analisi statistiche

La cinetica di maturazione meiotica è stata valutata mediante test chi quadro o test di fisher quando appropriato. La concentrazione di ATP e le variazioni del pattern elettroforetico delle proteine durante la progressione meiotica sono stati valutati mediante analisi della varianza (ANOVA) dopo analisi per l'omogeneità della varianza mediante il Levine's test. Le analisi statistiche sono state effettuate utilizzando il software Statgraphic Centurion XV (versione 15.2.06 per Windows; StatPoint, Inc.,

Herndon, VA, USA) e i valori sono stati considerati statisticamente significativi quanto $P < 0,05$.

8.3. RISULTATI

Valutazione della cinetica di progressione meiotica.

I nostri dati hanno riportato una differenza statisticamente significativa nella cinetica di maturazione di oociti di prepubere rispetto a quelli di adulto. Come mostrato nella figura 16, gli oociti immaturi di agnella e di pecora raggiungevano lo stadio di MI utilizzando un tempo differente. A 7 ore di coltura, le percentuali di MI ottenute negli oociti di prepubere erano minori ($P < 0,001$), rispetto a quelle ottenute negli oociti di individui adulti. Gli oociti immaturi di prepubere raggiungevano lo stadio di MI con una percentuale del 14,1% mentre quelli di adulto che raggiungevano questo stadio erano il 37,4%. Sarebbe che gli oociti di agnella abbiano circa un'ora di ritardo nel progredire verso la MI come mostrato dal fatto che la percentuale di MI inizia a crescere solo dalla 7 ora. La differenza nelle percentuali di MI viene mantenuta fino alla nona ora.

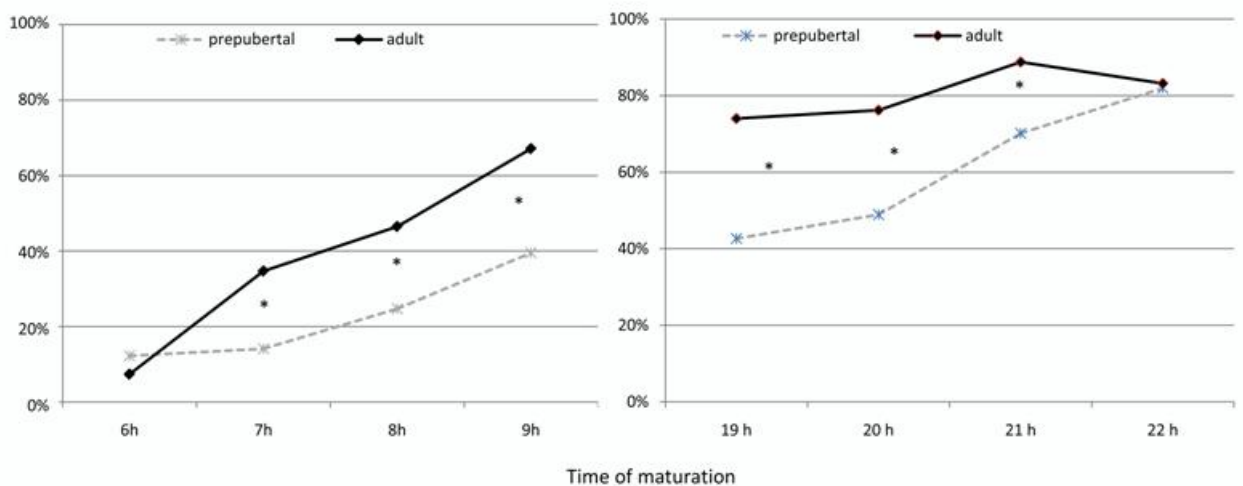


Figura 16. Cinetica della progressione meiotica durante la maturazione in vitro di oociti di prepubere e adulto . I valori sono espressi come percentuali di oociti che raggiungono (A) la MI tra 6 e 9 ore di maturazione in vitro e (B) la MII tra 19 e 22 ore di maturazione in vitro (*indica una differenza statistica tra i due gruppi sperimentali in ciascun tempo analizzato; test chi quadro: $P < 0,001$).

Il ritardo nella progressione meiotica di oociti di prepubere è stato confermato anche dai dati ottenuti durante la transizione tra MI e MII, monitorizzata tra 19 e 22 ore di maturazione in vitro. Come mostrato nella figura 17, lo stadio di MII è raggiunto prima negli adulti che nel prepubere ($P < 0,001$). Infatti alla 19° ora di coltura la piastra nucleare della MII era osservata nel 70,4% degli oociti adulti mentre in quelli di prepubere si attestava al 36,4%. Gli oociti di prepubere raggiungevano percentuali di MII simili a quelle dell'adulto solamente dopo 22 ore di coltura in vitro.

I patterns proteici di oociti di adulto e prepubere a diversi tempi della maturazione sono mostrati nella figura 17.

La figura 18 mostra la quantificazione degli spot risolti nei gels elettroforetici bidimensionali delle proteine estratte da oociti di prepubere e adulto a diversi tempi di maturazione in vitro. Dopo 9 ore di coltura in vitro il numero di spots era statisticamente minore nei gels di oociti di prepubere rispetto a quelli di adulto (295.6 ± 12.8 vs $376 \pm 14,2$ rispettivamente; $P < 0,05$), mentre alla 24° ora un maggior numero di spots era statisticamente maggiore nei prepuberi rispetto agli adulti (573 ± 11.9 vs 449.7 ± 15.2 ; $P < 0,01$).

Differenze qualitative, cioè spots presenti esclusivamente nei gels di prepubere o in quelli di adulto, sono mostrate nella tabella 8.

Gruppi	0h	7h	19h	24h
Prepuberi vs Adulti	0	62	8	121
Adulti vs Prepuberi	25	12	82	12

Tabella 8. Differenze qualitative negli spot presenti in gel elettroforetici bidimensionali di oociti di prepubere e adulto a differenti tempi di maturazione in vitro espresso come numero di spots proteici presenti esclusivamente in un gruppo rispetto all'altro.

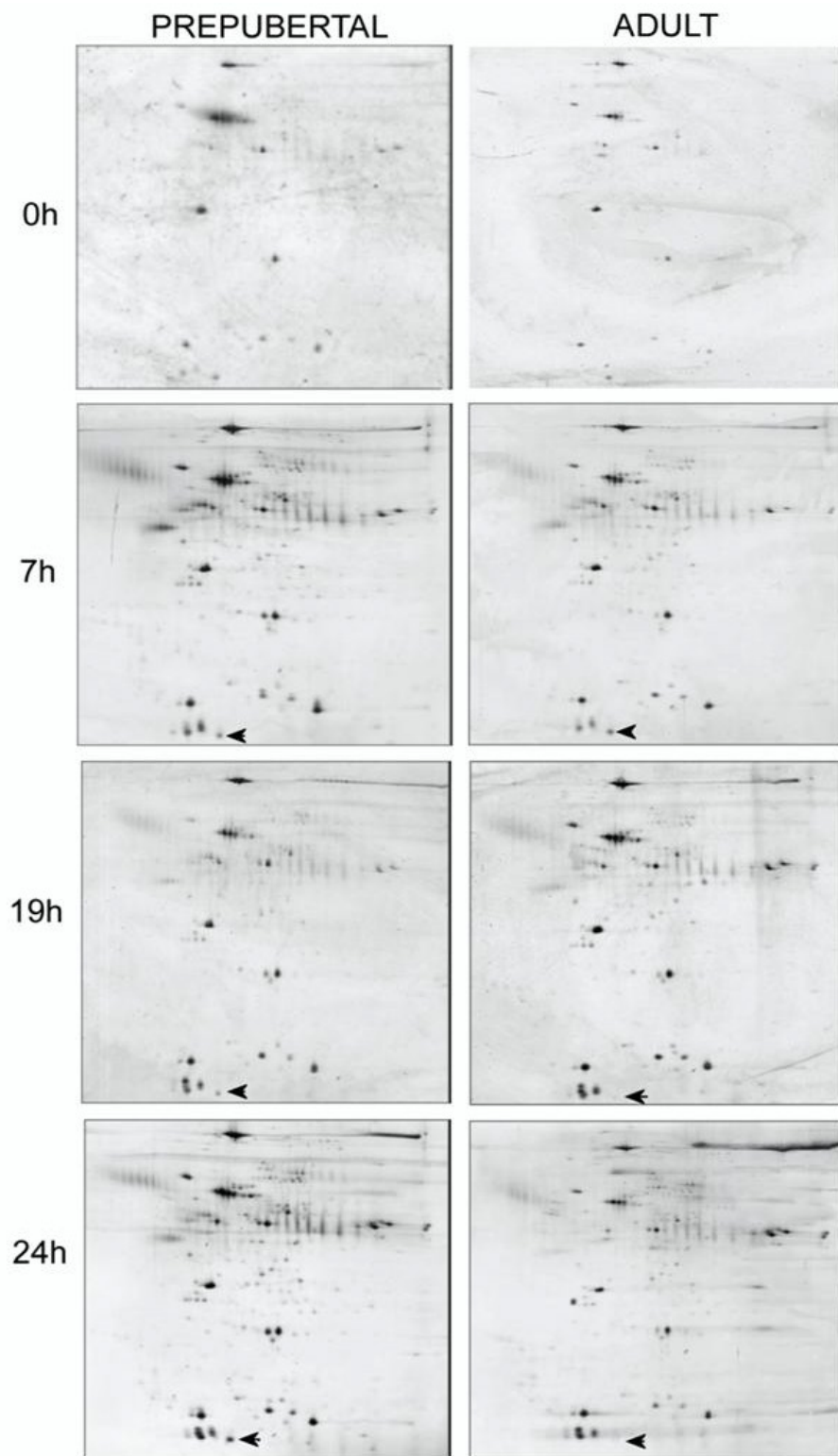


Figura 17. Gels elettroforetici bidimensionali rappresentativi delle proteine di oociti di prepubere e adulto a 0, 7, 19 e 24 ore di maturazione in vitro. La freccia rappresenta un esempio degli spots evidenziabili in gels di oociti di prepubere e adulto a 7 ore di maturazione e presenti solamente in quelli di prepubere a 19 e 24 ore di maturazione.

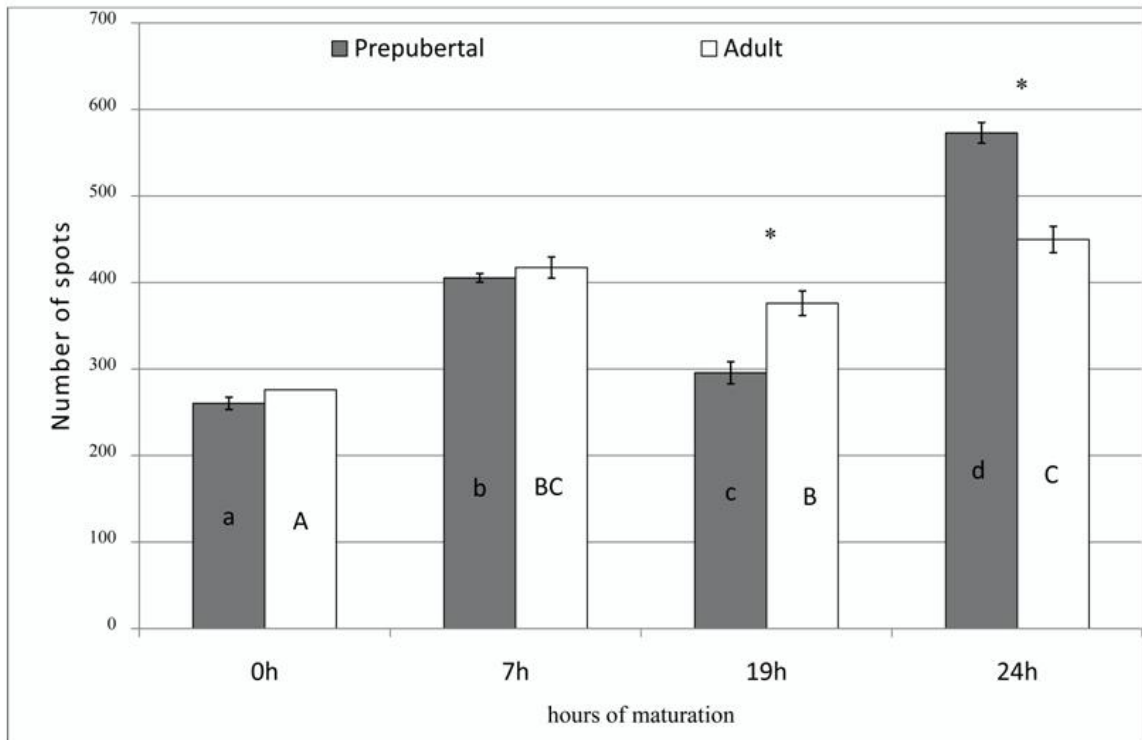


Figura 18. Quantificazione degli spots proteici evidenziabili nei gels elettroforetici delle proteine estratte da oociti di ovino prepubere o adulto a differenti tempi della maturazione in vitro (* indica una differenza statistica tra i due gruppi sperimentali per ciascun tempo analizzato; differenti lettere minuscole indicano statistica differenza tra diversi tempi nel gruppo dei prepuberi; differenti lettere maiuscole indicano statistica differenza tra diversi tempi nel gruppo degli adulti).

Quantificazione della concentrazione intracellulare di ATP.

La concentrazione di ATP durante la maturazione in vitro era minore in oociti di prepubere che in quelli di adulto (media \pm SEM, 2.32 ± 0.09 vs 3.24 ± 0.18 pmol/oocita rispettivamente). Negli oociti di adulto, dopo un declino significativo osservato tra 0 e 7 ore di maturazione (da 3.00 ± 0.26 pmol a 2.39 ± 0.10 pmol; $P < 0,01$), la concentrazione intra cellulare di ATP incrementava fino alla 19° ora raggiungendo 3.95 ± 0.24 pmol/oocita per poi rimanere stabile fino alla 24° ora.

Negli oociti di prepubere è stato osservato un pattern simile a quelli di adulto per quanto riguarda le prime 7 ore di coltura ma una aumento delle concentrazioni di ATP si ha solamente alla 19° ora e non raggiunge i livelli misurati nell'adulto alla 24° ora (Figura 19).

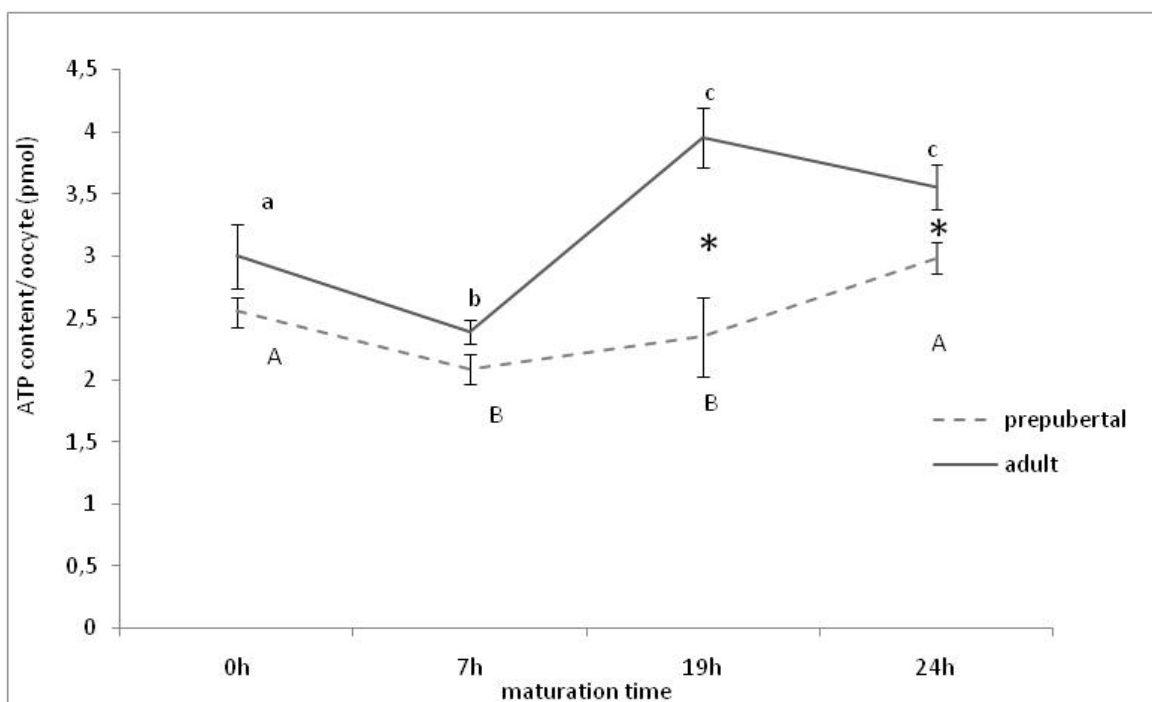


Figura 19. Fluttuazioni della concentrazione intracellulare di ATP in oociti di ovino prepubere e adulto durante la maturazione in vitro. I dati sono espressi come media \pm SEM. Le lettere minuscole indicano una statistica differenza tra differenti ore di maturazione nel gruppo degli oociti di animali adulti ANOVA $P < 0,01$. Lettere maiuscole indicano una differenza statisticamente significativa tra differenti tempi nel gruppo degli oociti di animali prepuberi; ANOVA $P < 0,01$.

8.4. DISCUSSIONE

Nel nostro lavoro abbiamo messo in relazione la cinetica della meiosi allo stato energetico e alla qualità del citoplasma dell'ocita di ovino. Abbiamo mostrato che la concentrazione dell'ATP e la sintesi proteica è alterata e determina un ambiente citoplasmatico incapace di promuovere lo sviluppo embrionale preimpianto.

In lavori precedenti è stata messa in evidenza una diversa cinetica di sviluppo embrionale preimpianto negli embrioni di prepubere rispetto a quelli di adulto, che era stata messa in relazione con la capacità di sviluppo. Gli oociti di prepubere fertilizzati in vitro presentavano infatti una bassa cinetica di sviluppo e una minore percentuale di sviluppo embrionale preimpianto fino allo stadio di blastocisti, rispetto alla controparte adulta (Leoni et al, 2006) e questo ha contribuito a classificare gli oociti di prepubere come "oociti di bassa qualità". La bassa qualità del citoplasma degli oociti di prepubere era precedentemente associata con difetti molecolari citoplasmatici (Leoni et al, 2007; Bebbere et al, 2009; Ledda et al, 2001).

La cinetica del primo ciclo mitotico è stata considerata come un marcatore del potenziale di sviluppo dell'embrione preimpianto (Loneragan et al, 2000; Fenwick et al, 2002). Questa sperimentazione ha messo in evidenza che un ritardo nei tempi di maturazione meiotica può essere messo in relazione alle differenze nella capacità di sviluppo osservate negli oociti di prepubere rispetto a quelli di adulto. Gli oociti di prepubere raggiungono lo stadio di MI un'ora in ritardo rispetto a quelli prelevati da animali adulti e questo ritardo cresce nel corso della maturazione meiotica. Dopo 19 ore di maturazione in vitro le percentuali di MII raggiunti da oociti di animali adulti sono più elevate rispetto a quelli di prepubere, che raggiungono percentuali comparabili solo dopo 21 ore di coltura. Questo ritardo sembrerebbe amplificato durante lo sviluppo embrionale, come riportato precedentemente dal nostro gruppo di ricerca (Leoni et al, 2006). In questo lavoro è stata evidenziata infatti una differenza della velocità di sviluppo tra embrioni di ovino prepubere e adulto, sia nella prima divisione mitotica con la formazione dell'embrione a due cellule, che nello sviluppo successivo, con il raggiungimento dello stadio di blastocisti che veniva ritardato di circa 24 ore nell'ocita di prepubere. Il primo ciclo meiotico nei mammiferi è caratterizzato da fasi sequenziali, come il completamento della meiosi, la decondenzazione della cromatina dello spermatozoo, la formazione dei pronuclei, la sintesi del DNA e la mitosi, che appaiono largamente controllati da fattori materni stoccati nell'ocita durante l'oogenesi (Wassarman and Kinloch, 1992). Ciascuna fase è sotto il controllo di un checkpoint che viene attivato solamente al momento in cui la fase precedente è stata completata (Fulka et al, 1995) perciò è stato ipotizzato che il ritardo del primo

ciclo meiotico nell'ocita di prepubere potesse essere dovuto ad un ambiente citoplasmatico deficitario al momento della fertilizzazione. Salamone et al (2001) hanno messo in evidenza che fattori chiave associati con la fertilizzazione, la prima divisione embrionale e lo sviluppo, erano compromessi in oociti di bovino prepubere. Sempre in questa specie Boni e coll (2002) hanno evidenziato, nell'ocita dei prepuberi, una alterazione della sintesi dei recettori per l'inositolo trifosfato, un secondo messaggero coinvolto nella regolazione dei canali del calcio e del rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico e quindi delle fluttuazioni del contenuto di calcio intracellulare che è correlato alla competenza meiotica dell'ocita e che potrebbe causare alterazione nel controllo nella transizione tra la fase G e la fase M del ciclo cellulare successivo (Kono et al, 1995; Marangos et al, 2003). Ledda e coll (1997, 2001) hanno mostrato negli oociti di ovino prepubere una diminuzione della sintesi proteica quantitativa e una alterata fluttuazione dell'attività dell'MPF, un fattore coinvolto nel controllo del ciclo cellulare, la cui attività è dipendente dalla sintesi della sua componente ciclina B durante la transizione tra MI e MII. L'attività di questo fattore era simile tra oociti di prepubere e adulto fino allo stadio di MI, mentre allo stadio di MII era minore negli oociti di prepubere, suggerendo anomalie nella sintesi proteica in questi oociti. È stata inoltre evidenziata, in oociti di prepuberi rispetto a quelli di adulto, una diminuzione nello stoccaggio di fattori coinvolti nel successivo sviluppo embrionale (Leoni et al, 2004). I fattori molecolari stoccati nel citoplasma dell'ocita durante la fase di crescita e maturazione sono indispensabili per le prime fasi del ciclo cellulare, prima dell'attivazione del genoma embrionario (Gandolfi and Gandolfi, 2001). È stato individuato nel topo un fattore proteico presente nell'ocita coinvolto nella fase di transizione tra il genoma materno e quello fetale (Wu et al, 2003), mentre nel bovino De Sousa e collaboratori hanno individuato 11 mRNA materni, presenti nel citoplasma dell'ocita, essenziali nel successivo sviluppo embrionale.

La nostra ipotesi è che l'ambiente citoplasmatico negli oociti di prepubere è alterato e/o mancante di molecole essenziali che sono necessarie per il controllo e la progressione nel ciclo meiotico e nel conseguente sviluppo embrionale.

La sintesi proteica negli oociti di mammifero è richiesta non solo per la ripresa meiotica (Tomek et al, 2002) ma anche per l'acquisizione della maturazione citoplasmatica. È stato mostrato che la sintesi proteica è elevata nelle prime fasi di maturazione, fino alla MI e quindi decrementa fino alla MII (Coenen et al, 2004). In precedenti lavori è stata evidenziata l'alterata espressione di alcuni geni (Leoni et al, 2007; Bebbere et al, 2009) e della fosforilazione ATP dipendente dell'attività di proteine chiave coinvolte nel controllo del ciclo cellulare (Ledda et al, 2001). Levesque e Sirard (1994) hanno riportato differenze nei profili delle proteine totali tra oociti di bovino adulto e

prepubere prima della maturazione e hanno messo in relazione alla competenza allo sviluppo. Oociti di ovino prepubere incorporano meno metionina durante la maturazione in vitro [Ledda et al, 2001, Kochhar et al, 2002), suggerendo un decremento nella sintesi proteica rispetto a oociti di animali adulti. La riprogrammazione della sintesi proteica ha un ruolo fondamentale nel controllo del ciclo meiotico ed è un processo essenziale nella preparazione di oociti di mammifero per la fecondazione. Gandolfi e collaboratori (1998) hanno evidenziato che la sintesi proteica diminuisce in oociti di prepubere tra le 6 e le 9 ore di maturazione in vitro mentre negli adulti in simile decremento era misurabile solo tra 21 e 24 ore di coltura. Nei nostri esperimenti abbiamo messo in evidenza l'importanza di una corretta fluttuazione del pattern proteico per la determinazione della qualità dell'oocita maturo. Il numero di proteine totali cresce durante le prime 7 ore di maturazione nei gels di oociti sia di adulto che di prepubere ma, mentre negli adulti rimane costante fino alla 24° ora, nei prepuberi diminuisce per poi risalire, arrivando a livelli simili a quelli dell'adulto solo dopo 24 ore, quando, alcune proteine che non risultavano espresse nei gels dei tempi precedenti erano presenti. Sembra che negli oociti di prepubere la macchina citoplasmatica sia difettosa e possa causare un ritardo nella sintesi di proteine necessarie per la progressione da MI ad MII. Si potrebbe ipotizzare la presenza di un check point attivato solo quando un ben determinato stato citoplasmatico molecolare è stato raggiunto e l'oocita ha acquisito tutte le capacità per sintetizzare le proteine necessarie per il successivo sviluppo.

La disponibilità di energia sotto forma di ATP è di importanza critica per i corretti eventi della maturazione citoplasmatica e nucleare. La formazione del fuso e la disposizione dei cromosomi dipendono dall'espressione e attività delle proteine motrici, che utilizzano ATP come sorgente di energia. Una volta che l'oocita riprende la maturazione meiotica, i mitocondri provvedono alla sintesi dell'ATP necessario per l'organizzazione citoscheletrica e citoplasmatica (Eichenlaub-Ritter et al, 2004). Il risultato della fecondazione in vitro e la capacità di sviluppo dell'embrione sono state messe in relazione sia all'ATP che ai mitocondri contenuti nell'oocita (Santos et al, 2006). I nostri dati hanno evidenziato che il contenuto di ATP in oociti di adulto decrementa durante la transizione GV/MI, per incrementare e raggiungere un plateau a 19 ore. Negli oociti di prepubere l'incremento dell'ATP è ritardato e non raggiunge livelli comparabili a quelli dell'adulto. Gli oociti possono utilizzare una grande quantità di ATP per la sintesi proteica e queste proteine sono necessarie per la rottura della vescicola germinale e la progressione verso la MI. In concomitanza con la transizione GVBD/MI, le proiezioni citoplasmatiche tra le cellule del cumulo ooforo e l'oocita vengono retratte per cui gli scambi tra questi due compartimenti sono ridotti al

minimo e l'oocita perde il contributo di energia derivato dalle cellule del cumulo (Downs, 1995). In uno studio sulla distribuzione dei mitocondri attivi effettuato nel nostro laboratorio e in corso di pubblicazione (Leoni et al, submitted) gli oociti di ovini prepuberi e adulti sono stati classificati in tre gruppi, in relazione al fenotipo della distribuzione citoplasmatica durante la maturazione in vitro, e correlati alla competenza allo sviluppo. Una distribuzione fine, omogeneamente dispersa di mitocondri attivi durante la maturazione in vitro potrebbe essere un indicatore di scarsa capacità allo sviluppo, essendo stata messa in evidenza principalmente in oociti di ovini prepubere allo stadio di GV e MII. La maggior parte degli oociti di adulto in GV presentano la stessa distribuzione finemente dispersa dei mitocondri attivi degli oociti di prepubere, ma allo stadio di MII, questo fenotipo viene perso e si presenta un'aggregazione di mitocondri granulare e per la maggior percentuale, clusterizzata. Questa distribuzione si accompagna a un'elevata concentrazione di ATP presente nell'oocita di adulto alla MII suggerendo che la clusterizzazione mitocondriale è correlata a un incremento dell'attività mitocondriale e a una maggiore concentrazione citoplasmatica di ATP. Al contrario la persistenza della distribuzione diffusa, non clusterizzata di mitocondri, indica la loro bassa attività e giustifica la bassa concentrazione di ATP misurata negli oociti di prepubere. In conclusione possiamo affermare che l'utilizzo dell'elettroforesi bidimensionale e capillare ci ha permesso di mettere in evidenza deficienze molecolari tra oociti di differente qualità che determinano il destino di un embrione e contribuiscono a chiarire i meccanismi biochimici associati con la progressione meiotica e l'acquisizione della competenza allo sviluppo. Abbiamo dimostrato che la concentrazione dell'ATP gioca un ruolo chiave nella determinazione della cinetica di maturazione e nella corretta fluttuazione del pattern proteico, che determina una alterata costituzione citoplasmatica e influenza negativamente il successivo sviluppo embrionale. Possiamo ipotizzare che oociti con scarsa capacità di sviluppo abbiano un metabolismo energetico diminuito, probabilmente relazionabile allo stato funzionale dei mitocondri e al loro stato di aggregazione, che determina un ritardo nei tempi fisiologici del successivo sviluppo embrionale. Ulteriori analisi sono sicuramente necessarie per determinare la causa di questa anomalia, che potranno permettere di studiare nuovi approcci per l'applicazione efficiente delle biotecnologie riproduttive in campo umano e animale.

9. CONCLUSIONI

In conclusione possiamo affermare che l'utilizzo dell'analisi proteomica e metabolomica mediante l'impiego di tecniche elettroforetiche su gel o in fase libera coadiuvata da sistemi di rivelazione utilizzando spettrofotometria in ultravioletto, spettrometria di massa e fluorescenza laser indotta costituisce un valido strumento nella valutazione di biomarcatori molecolari della qualità dei gameti maschile e femminile sia in condizioni non fisiologiche che nell'applicazione di biotecnologie riproduttive.

Mediante l'impiego di questi sistemi abbiamo potuto correlare la metabolomica del plasma seminale di arieti ipofertili trattati ormonalmente con inserti sottocutanei di melatonina con le caratteristiche funzionali del testicolo e quelle qualitative del seme. Questo approccio ha messo in evidenza la possibilità di utilizzare l'elettroforesi capillare munita di rilevatore di massa per la determinazione di biomarcatori capaci di rivelare l'efficacia del trattamento farmacologico mettendo in evidenza un benefico effetto sulle concentrazioni di carnitina e acilcarnitina e su alcuni aminoacidi quali la glutammina, correlabili alla funzionalità spermatica.

Abbiamo utilizzato la specie equina come modello animale per la determinazione delle caratteristiche energetiche della cellula spermatica in relazione all'età, valutando l'assenza di modificazioni delle concentrazioni di ATP in stalloni utilizzati per la raccolta del seme in una stazione di monta. La valutazione elettroforetica delle concentrazioni di ATP in spermatozoi di cavalli ipofertili, con ridotta vitalità e motilità spermatica ci consente di affermare che questa molecola non è relazionabile a questi parametri in quanto non ha presentato nessuna variazione statistica rispetto a dei controlli con fertilità normale. Per contro è stato evidenziato che le caratteristiche proteomiche del plasma seminale sono relazionabili alla qualità dello spermatozoo.

Lo studio elettroforetico della stessa molecola energetica nel gamete femminile ha invece messo in evidenza la sua importanza nel determinare la capacità di sviluppo dell'ocita e nel permettere la preparazione del proteoma citoplasmatico necessario per terminare il ciclo meiotico e predisporre le basi per il successivo sviluppo embrionale.

Naturalmente sono necessarie ulteriori ricerche, specialmente in campo proteomico per determinare i fattori coinvolti nelle alterazioni studiate e poter determinare più finemente delle molecole indicatori di qualità dello spermatozoo e dell'ocita, che possano fungere da biomarcatori per lo sviluppo di nuovi strumenti analitici.

Saranno inoltre necessarie delle ricerche volte a determinare una corrispondenza di questi parametri, ottenuti utilizzando approcci innovativi come la metabolomica e la

proteomica, con l'impiego in campo pratico di queste tecnologie, che richiedono in ultima analisi la conferma dei risultati con il marcatore per eccellenza: la nascita di un individuo.

10. BIBLIOGRAFIA

- Agarwal A, Makker K, Sharma R (2008) Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 59:2–11.
- Agarwal A, Nallella K P, Allamaneni,SS, Said TM (2004) Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reprod Biomed Online* 8:616–627.
- Ahluwalia e Graham, 1966
- Aitken RJ, Baker MA (2007) The role of proteomics in understanding sperm cell biology. *Int J Androl* 31:295-302.
- Aitken RJ, Nixon B (2009) Proteomics of human sperm. In Krause WK, Naz RK. *ImmuneInfertility* Berlin Springer Verlag pp 3-12.
- Aitken RJ, Smith TB, Jobling MS, Baker MA, De luliis GN (2014) Oxidative stress and male reproductive health. *Asian J Androl* 16:31-8.
- Allen WR, Wilsher S (2012) The influence of mare numbers, ejaculation frequency and month on the fertility of Thoroughbred stallions. *Equine Vet J* 44:535-41.
- Amann RP, Cristanelli MJ, Squires EL (1987) Proteins in stallion seminal plasma. *J Reprod Fertil Suppl* 35:113-20.
- Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J (2013) Mitochondria functionality and sperm quality. *Reproduction* 146:R163-74.
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P and Katsiki E (2013) Fertility in the Aging Male: Molecular Pathways in the Anthropology of Aging. *Coll Antropol* 2:657–661.
- Arendt J (2005) Melatonin in humans: it's about time. *J Neuroendocrinol* 17:537–538.
- Audhya T, Reddy J, and Zaneveld LJD (1987) Purification and partial chemical characterization of a glycoprotein with antifertility activity from human seminal plasma. *Biol Reprod* 36:511-521.
- Aumuller G, Vesper M, Seitz J, Kemme M, Sheit K (1988) Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell Tissue Res* 252:377-384.
- Autiero M, Sansone G, and Abrescia P (1991) Relative ratios of lactoferrin, albumin, and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in fertile and infertile men. *J Androl* 12:191-200.
- Baker MA, Witherdin R, Hetherington L, Cunningham-Smith K, Aitken RJ (2005) Identification of post-translational modifications that occur during sperm maturation using difference in two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 5:1003-1012.
- Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M (2005) Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril* 84:662–71.
- Banez LL, Srivastava S, Moul JW (2005) Proteomics in prostate cancer. *Curr Opin Urol*

15:151–6.

- Barrios B, Fernández-Juan M, Muiño-Blanco Tand Cebrián-Pérez JA (2005) Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins which protect ram spermatozoa against cold-shock. *J Androl* 26:539–549.
- Batruch I, Lecker I, Kagedan D, Smith CR, Mullen BJ, Grober E, Lo KC, Diamandis EP, Jarvi KA (2011) Proteomic analysis of seminal plasma from normal volunteers and postvasectomy patients identifies over 2000 proteins and candidate biomarkers of the urogenital system. *J Proteome Res* 10:941–53.
- Bauer ME, Muller GC, Correa BL, Vianna P, Turner JE, Bosch JA (2013) Psychoneuroendocrine interventions aimed at attenuating immunosenescence: a review. *Biogerontology* 14: 9–20.
- Bebbere D, Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Leoni G, Ledda S (2009) Embryos produced in vitro from prepubertal lamb and adult sheep oocytes display different gene expression patterns. *Reproduction Fertility and Development* 21: 187-188.
- Bergeron A, Villemure M, Lazure C and Manjunath P (2005) Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 71:461–470.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* 6:317-339.
- Bjorndahl L (2010) The usefulness and significance of assessing rapidly progressive spermatozoa. *Asian J Androl* 12:33–35.
- Bjorndahl L, Kvist U (2010) Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges. *Mol Human Reprod* 16:23–29.
- Blanchard TL, Varner DD, Love CC, Brinsko SP, Morehead JP (2012) Management options for the aged breeding stallion with declining testicular function. *J Equine Veterinary Science* 32:430-435.
- Boni R, Cuomo A, Tosti E (2002) Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus–oocyte complex (COC) grade, calcium current activity and calcium stores. *Biol Reprod* 66:836–842.
- Brandon CI, Heusner GL, Caudle AB and Fayrer-Hosken RA (1999) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. *Theriogenology* 52:863–873.
- Breitbart H and Naor Z (1999) Protein kinases in mammalian sperm capacitation and the acrosome reaction. *Rev Reprod* 4:151–159.
- Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Day BC, Wilson ME (2005) Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology* 63:1519–1527.
- Brooks DE (1979a) Carnitine, acetylcarnitine and the activity of carnitine acyltransferases in seminal plasma and spermatozoa of men, rams and rats. *J Reprod Fertil* 56:667–673.
- Buff PR, Morrison CD, Ganjam VK, Keisler DH (2005) Effects of short-term feed

deprivation and melatonin implants on circadian patterns of leptin in the horse. *J Anim Sci* 83:1023-32.

- Bugno M, Jablonska Z, Tischner M, Klukowska-Rötzler J, Pienkowska-Schelling A, Schelling C, Slota E (2010) Detection of sex chromosome aneuploidy in equine spermatozoa using fluorescence in situ hybridization. *Reprod Domest Anim* 45:1015-9.
- Cancel AM, Chapman DA, Killian GJ (1997) Osteopontin is the 55kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 57:1293-1301.
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004) Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* 25:1327-1333.
- Cappelletto M, Del Corso A, Camici M, Mura U (1993) Thiol and disulfide determination by free zone capillary electrophoresis. *J Biochem Biophys Meth* 26:335-341.
- Casao A, Luna C, Perez-Pe R, Muino- Blanco T, Cebrian-Perez JA (2012b) Receptor mediated effect of melatonin on ram sperm calcium patterns. In: Rodriguez-Martinez H (ed), 11th International Congress of the Spanish Association for Animal Reproduction, Cordoba. *Reprod Domest Anim* 47 S3 Wiley-Blackwell, New York, NY.
- Casao A, Mendoza N, Perez-Pe R, Grasa A, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muino-Blanco T (2010) Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *J Pineal Res* 48:39-46.
- Casao A, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JÁ (2013) The effect of exogenous melatonin during the non-reproductive season on the seminal plasma hormonal profile and the antioxidant defence system of Rasa Aragonesa rams. *Anim Reprod Sci* 138:168-74.
- Casao A, Vega S, Palacin I, Perez- Pe R, Lavina A, Quintin FJ, Sevilla E, Abecia JA, Cebrián-Pérez JA, Forcada F, Muiño-Blanco T (2010) Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in rasa Aragonesa rams. *Reprod Domest Anim* 45:425-432.
- Cebrian-Perez et al, 2013
- Čerovský J, Frydrychová S, Lustyková A, Rozkot M (2007) Relationship between abnormal spermatozoa and seminal plasma free aminoacids in boars. *Czech Journal of Animal Science* 52:44-49.
- Chalah T, Brillard JP (1998) Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology* 50:487-93.
- Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpoux B (2008) Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. *Reprod Domest Anim* 43:40-7.
- Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J, Pelletier J (1992) Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *Anim Reprod Sci* 30:157-84.
- Chen H, Stanley E, Jin S, Zirkin BR (2010) Stem Leydig cells: from fetal to aged animals. *Birth Defects Res Embryo Today* 90:272–283.
- Chen H, Zirkin BR (1999) Long term suppression of Leydig cell steroidogenesis

prevents Leydig cell aging. Proc Natl Acad Sci USA 96:14877–14881.

- Coenen K, Massicotte L, Sirard MA (2004) Study of newly synthesized proteins during bovine oocyte maturation in vitro using image analysis of two-dimensional gel electrophoresis. Mol Reprod Dev 67:313-322.
- Cooper TG, Yeung CH, Weinbauer GF (1986b) Transport of carnitine by the epididymis of the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). J Reprod Fertil 77:297–301.
- Cross NL (1993) Multiple effects of seminal plasma on the acrosome reaction of human sperm. Mol Reprod Dev 35:316–323.
- da Silva CM, Macías-García B, Miró-Morán A, González-Fernández L, Morillo-Rodríguez A, Ortega-Ferrusola C, Gallardo-Bolaños JM, Stilwell G, Tapia JA, Peña FJ (2011) Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. J. Pineal Res 51:172-9.
- Dal Canto M, Cotichio G, Mignini Renzini M, De Ponti E, Novara PV, Brambillasca F, Comi R, Fadini R (2012) Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. Reprod Biomed Online 25:474-480.
- Dang-Nguyen TQ, Kikuchi K, Somfai T, Ozawa M, Nakai M, Maedomari N, Viet-Linh N, Kanai Y, Nguyen BX, Nagai T (2010) Evaluation of developmental competence of in vitro-produced porcine embryos based on the timing, pattern and evenness of the first cleavage and onset of the second cleavage. J Reprod Dev 56:593-600.
- Dass C (2007) Protein and peptides: structure determination in Fundamentals of contemporary mass spectrometry Wiley pp.289-332.
- de Lamirande E, Gagnon C (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. J Androl 13:368–78.
- de Lamirande E, Gagnon C (1992) Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. J Androl 13:379–86.
- De Reviers MM, Ravault JP, Tillet Y, Pelletier J (1989) Melatonin binding sites in the sheep pars tuberalis. Neurosci Lett 100:89-93.
- De Rosa M, Boggia B, Amalfi B, Zarrilli S, Vita A, Colao A, Lombardi G (2005) Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal characteristics in men with semen dysfunction of various origins. Drugs R D 6:1-9.
- Deepinder F, Chowdary HT, Agarwal A (2007) Role of metabolomic analysis of biomarkers in the management of male infertility. Expert Rev Mol Diagn 7:351–8.
- Desnoyers L, ManjunathP (1992) Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. J. Biol Chem 267:10149–10155.
- Dole M (1968) Molecular beams of Microions. J Chem Phys 49:2240.
- Dominko T, First NL (1997) Timing of meiotic progression in bovine oocytes and its effect on early embryo development. Mol Reprod Dev 47:456-467.
- Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W (1998) In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome.

Fertil Steril 70:305–314.

- Downs SM (1995) The influence of glucose, cumulus cells, and metabolic coupling on ATP levels and meiotic control in the isolated mouse oocyte. *Dev Biol* 167:502-512.
- Dumollard R, Duchen M, Carroll J (2007) The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr Top Dev Biol* 77:21-49.
- Earl CR, Fry RC, Maclellan LJ, Kelly JM, Armstrong DT (1998) In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes. In: Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L, editors. *Gametes: development and function*. Milan, Italy: Serono Symposia. pp. 115-137.
- Eichenlaub-Ritter U, Vogt E, Yin H, Gosden R (2004) Spindles, mitochondria and redox potential in ageing oocytes. *Reprod Biomed Online* 8:45-58.
- Eliasson R (2010) Semen analysis with regard to sperm number, sperm morphology and functional aspects *Asian J Androl* 12:26–32.
- Eng LA, Ax RL, Oliphant G (1978) Rabbit sperm reversible decapacitation by membrane stabilization with a highly purified glycoprotein from seminal plasma. *Biol Reprod* 19:1083-1094.
- Escrich L, Grau N, de los Santos MJ, Romero JL, Pellicer A, Escribá MJ (2012) The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril* 98:1147-1151.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M (2002) Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod* 17: 407-412.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA (2009) Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology* 71:836-848.
- Fujinoki M (2008) Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* 136:533-41.
- Fukuda T, Kikichi M, Kurotaki T, Oyamada T, Yoshikawa H, Yoshikawa T (2001) Age-related changes in the testes of horses. *Equine vet J* 33:20-25.
- Fulka Jr J, Moor RM, Fulka J (1995) Mouse oocyte maturation: meiotic checkpoints. *Exp Cell Res* 219:414–419.
- Gadella BM (2009) Sperm surface proteomics. In Krause WK, Naz RK. *Immune infertility: the impact of immunoreactions of human infertility*. Berlin Springer Verlag pp38-48.
- Gandolfi and Gandolfi, 2001
- Gandolfi F, Milanese E, Pocar P, Luciano AM, Brevini TA, Acocella F, Lauria A, Armstrong DT (1998) Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 49:168-175.
- Garcia-Perez A, Burg MB (1991) Role of organic osmolytes in adaptation of renal cells to high osmolality. *J Membrane Biol* 119:1–13.
- García-Villalba R, León C, Dinelli G, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, García-Cañas V, Cifuentes A (2008) Comparative metabolomic study of transgenic

versus conventional soybean using capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1195:164-73.

- Gardner DK, Lane M (2005) Ex vivo early embryo development and effects on gene expression and imprinting. *Reprod Fertil Dev* 17:361-370.
- Geer RW (1967) dietary choline requirements for sperm motility and normal mating activity in *Drosophila melanogaster*. *Biological Bulletin* 133:548-566.
- Gehlen H, Bartmann CP, Klug E, Schoon HA (2001) Azoospermia due to testicular degeneration in a breeding stallion. *J Equine Vet Sci* 21:137-139.
- Gerena RL, Irikura D, Urade Y, Eguchi N, Chapman DA, Killian GJ (1998) Identification of a fertility-associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biol Reprod* 58:826-833.
- Gidding JC (1984) Two-dimensional separation: concept and promise. *Anal Chem* 56:1258A-1260A, 1262A, 1264A.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21:1037-1053.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4:3665-3685.
- Guérin Y, Cognie Y and Poulin N (1992) Freezability of freshly ejaculated and frozen ram semen in vitro. In: *Proceedings of the 12th international congress on animal reproduction* 1418-1420.
- Gwathmey TM, Ignatz GG, Suarez SS (2003) PDC-109(BSP-A1/A2) promotes bull sperm binding to oviductal epithelium in vitro and may be involved in forming the oviductal sperm reservoir. *Biol Reprod* 69:809-815.
- Hardeland R (2013) Melatonin and the theories of ageing: a critical appraisal of melatonin's role in anti-ageing mechanisms. *J Pineal Res* 55:325-356.
- Henricks DM, Kouba AJ, Lackey BR, Boone WR and Gray SL (1998) Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. *Biol Reprod* 59:330-337.
- Herbert BR, Sanchez J-C, Bini L (1997) Two-dimensional electrophoresis: the state of the art and future directions. in : *Proteome Research : New Frontiers in Functional genomics*, Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrassere DF, eds. Berlin : Springer-Verlag.
- Hess e Roser (2001)
- Ibrahim MAR, Boldizar H (1981) Studies on free amino acid content in seminal plasma of I. A. bulls of different performance. *Acta Acad Sci Hung* 29:263-269.
- Iribarne JV, Thomson BA (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* 64:2287.
- Jang SW, Liu X, Pradoldej S, Tosini G, Chang Q, Iuvone PM, Ye K (2010) N-acetylserotonin activates TrkB receptor in a circadian rhythm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3876-81.
- Jeulin C, Lewin LM (1996) Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-

gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2:87-102.

- Ji YL, Wang H, Meng C, Zhao XF, Zhang C, Zhang Y, Zhao M, Chen YH, Meng XH, Xu DX (2012) Melatonin alleviates cadmium-induced cellular stress and germ-cell apoptosis in testes. *J Pineal Res* 52:71–79.
- Jin LT, Hwang SY, Yoo GS, Choi JK (2004) Sensitive silver staining of protein in sodiumdodecyl sulfate-polyacrylamide gels using an azo dye, calconcarboxylic acid, as a silver-ion sensitizer. *Electrophoresis* 25:2494-2500.
- Johansen & Bohmer (1979) Motility Related to the Presence of Carnitine/Acetyl-Carnitine in Human Spermatozoa. *International Journal of Andrology* 2:202–210.
- Johnson AR, Lao S, Wang T, Galanko JA, Zeisel SH (2012) Choline Dehydrogenase Polymorphism rs12676 Is a Functional Variation and Is Associated with Changes in Human Sperm Cell Function. *PLoS ONE* 7:e36047.
- Johnson L, Varner DD, Tatum ME, Scrutchfield WL (1991) Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. *Biol Reprod* 45:404–410.
- Jones LS, Berndtson WE (1986) A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion. *Biol Reprod* 35:138–148.
- Kennaway DJ, Gilmore TA (1985) Effects of melatonin implants in ram lambs. *J Reprod Fertil* 73:85-91.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA (1993) Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod* 49:1202-7.
- Kochhar HP, Wu B, Morris LH, Buckrell BC, Pollard JW, Basrur PK, King WA (2002) Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. *Reprod Domest Anim* 37:19-25.
- Kokolis N, Theodosiadou E, Tsantariotou M, Rekkas C, Goulas P, Smokovitis A (2000) The effect of melatonin implants on blood testosterone and acrosin activity in spermatozoa of the ram. *Andrologia* 32:107-114.
- Kono T, Carroll J, Swann K, Whittingham DG (1995) Nuclei from fertilized mouse embryos have calcium-releasing activity. *Development* 121:1123–1128.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Laflamme BA, Wolfner MF (2013) Identification and function of proteolysis regulators in seminal fluid *Mol Reprod Dev* 80:80–101.
- Lamb DJ (2009) A look towards the future: advances in andrology expected to revolutionize the diagnosis and treatment of the infertile male. In: Lipshultz L, Howards S, Niederberger C, eds. *Infertility in the male*. Cambridge: Cambridge University Press pp.642–53.
- Ledda S, Bogliolo L, Calvia P, Leoni G, Naitana S (1997) Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. *Journal of Reproduction and Fertility* 109:73-78.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Calvia P, Naitana S (1996) Influence of vasoactive intestinal peptide (VIP), atrial natriuretic peptide (ANP) and insulin-like growth factor-

I (IGF-I) on in vitro maturation of prepubertal and adult sheep oocytes. *Zygote* 4:343-348.

- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Loi P, Cappai P, Naitana S (1998) Meiotic and developmental competence of in vitro matured lamb oocytes. In: Lauria A, Gandolfi F, Enne G, Gianaroli L, editors. *Gametes: development and function*. Milan, Italy: Serono Symposia. pp. 101-113.
- Ledda S, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S (2001) Cell coupling and maturation-promoting factor activity in in vitro-matured prepubertal and adult sheep oocytes. *Biol Reprod* 65:247–252.
- Lenzi A, Lombardo F, Sgro P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F, Gandini L (2003) Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 79:292–300.
- Leoni G, Bebbere D, Succu S, Berlinguer F, Mossa F, Galioto M, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S (2007) Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 74:249-257.
- Leoni G, Ledda S, Bogliolo L, Succu S, Rosati I, Bebbere D, Pintus PP, Naitana S (2004) Ovine prepubertal oocyte shows alterate gene expression and low developmental competence. *Reprod Fert Dev* 16:240.
- Leoni G, Rosati I, Succu S, Bogliolo L, Bebbere D, Berlinguer F, Ledda S, Naitana S (2007) A low oxygen atmosphere during IVF accelerates the kinetic of formation of in vitro produced ovine blastocysts. *Reproduction in Domestic Animals* 42:299-304.
- Leoni G, Succu S, Berlinguer F, Rosati I, Bebbere D, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S (2006) Delay on the in vitro kinetic development of prepubertal ovine embryos. *Animal Reproduction Science* 92:373-383.
- Lévesque JT, Sirard MA (1994) Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. *Reprod Nutr Dev* 34:133-139.
- Li L, Xu JN, Wong JTY, Pang SF, Shiu YW (1998) Molecular and cellular analyses of melatonin receptor-mediated cAMP signaling in rat corpus epididymis. *J Pineal Res* 25:219-228.
- Lincoln GA, Almeida OF, Arendt J (1981) Role of melatonin and circadian rhythms in seasonal reproduction in rams. *J Reprod Fertil Suppl* 30:23-31.
- Liu DY, Baker HWG (1993) Inhibition of acrosin activity with a trypsin inhibitor blocks human sperm penetration of the zona pellucid. *Biol Reprod* 48:340-348.
- Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A (2011) The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl* 13:690–697.
- Lonergan P, Fair T (2008) In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 69:17-22.
- Lonergan P, Gutiérrez-Adán A, Pintado B, Fair T, Ward F, Fuente JD, Boland M (2000) Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts

produced in vitro. *Mol Reprod Dev* 57:146-152.

- Madeddu M, Berlinguer F, Pasciu V, Succu S, Satta V, Leoni GG, Zinellu A, Muzzeddu M, Carru C, Naitana S (2010) Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (*Gallus gallus domesticus*) and the Barbary partridge (*Alectoris barbara*). *Theriogenology* 74:1010-8.
- Magistrini M, Vidament M, Clement F, Palmer E (1996) Fertility prediction in stallions. *J Anim Reprod Sci* 42:181–188.
- Makker K, Agarwal A, Sharma R (2009) Oxidative stress and male infertility. *Indian J Med Res* 129:357–367.
- Maklashina E, Ackrell BA (2004) Is defective electron transport at the hub of aging? *Aging Cell* 3:21–27.
- Malpoux B, Daveau A, Maurice F, Gayrard V, Thiery JC (1993) Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol Reprod* 48:752-760.
- Manjunath P and Thérien I (2002) Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 53:109–119.
- Manjunath P, Chandonnet L, Leblond E and Desnoyers L (1993) Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol Reprod* 49:27–37.
- Marangos P, Fitz-Harris G, Carroll J (2003) Ca²⁺ oscillations at fertilization in mammals are regulated by the formation of pronuclei. *Development* 130:1461–1472.
- Marcus K, Joppich C, May C, Pfeiffer K, Sitek B, Meyer H, Stuehler K (2009) High resolution 2DE. *Methods Mol Biol* 519:221-40.
- Martinez-Heredia J, Estanyol JM, Balleca JL, Oliva R (2006) Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics* 6:4356-4369.
- Maxwell WM, de Graaf SP, Ghaoui Rel H, Evans G (2007) Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Supp* 64:13–38.
- McDowell KJ, Little TV, Timoney PJ, and Adams MH (1996) Characterization of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. *Res Vet Sci* 61:33-37.
- Meehan KL, Rainczuk A, Salamonsen LA, Stephens AN (2010) Proteomics and the search for biomarkers of female reproductive diseases. *Reproduction* 140:505–519.
- Milardi D, Grande G, Vincenzoni F, Messina I, Pontecorvi A, de Marinis L, Castagnola M, Marana R (2012) Proteomic approach in the identification of fertility pattern in seminal plasma of fertile men. *Fertil Steril* 97:67–73.
- Miller DJ, Winer MA, Ax RL (1990) Heparin binding proteins from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. *Biol Reprod* 42:899-915.
- Morgan PJ, Mercer JG (1994) Control of seasonality by melatonin. *Proc Nutr Soc* 53:483-493.
- Mortarino M, Tedeschi G, Negri A, Cecilian F, Gottardi L, Maffeo G, Ronchi S (1998) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis map of bull seminal plasma

proteins. *Electrophoresis* 19:797–801.

- Morton KM (2008) Developmental capabilities of embryos produced in vitro from prepubertal lamb oocytes. *Reprod Domest Anim* 43 Suppl 2:137-143.
- Musters CC, van den Broek J, Welling E, van Weeren R, van Oldruitenborgh-Oosterbaan MM (2013) A prospective study on a cohort of horses and ponies selected for participation in the European Eventing Championship: reasons for withdrawal and predictive value of fitness tests. *BMC Vet Res* 9:182.
- Nagano M, Katagiri S, Takahashi Y (2006) ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. *Zygote* 14:299-304.
- Newmark et al, 1967
- Nicholson JK, Lindon JC (2008) Systems biology: metabolomics. *Nature* 455:1054–1056.
- Nuzzo NA, Anderson Ra Jr, Zaneveld LJD (1990) Proacrosin and acrosin release during the guinea pig acrosome reaction. *Mol Repro Dev* 25:52-60.
- O'Brien JK, Dwarte D, Ryan JP, Maxwell WM, Evans G (1996) Developmental capacity, energy metabolism and ultrastructure of mature oocytes from prepubertal and adult sheep. *Reprod Fertil Dev* 8:1029-1037.
- O'Farrell PH (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J BiolChem* 250:4007-21.
- O'Flaherty C, de Lamirande E, Gagnon C (2006) Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med* 41:528-40.
- Oliva R, De Mateo S, Estanyol JM (2009) Sperm cell proteomics. *Proteomics* 9:1004-1017.
- Oliva R, Martinez-Heredia J, Estanyol JM (2008) Proteomics in the study of the sperm cell composition, differentiation and function. *Syst Biol Reprod Med* 54:23-36.
- Ong S and Pandey A (2001) An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng vol 18 pp.195-205.*
- Ortiz A, Espino J, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, Garcia JF, Pariente JA, Rodriguez AB (2011) High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. *J Pineal Res* 50:132–139.
- Palacin I, Abecia JA, Forcada F, Casao A, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Palacios C, Pontes JM (2008) Effect of exogenous melatonin treatment on out of season ram fertility. *Ital J Anim Sci* 7:199-206.
- Papp GY, Grof J, Menyhart J (1983) The Role of Basic Amino Acids of the Seminal Plasma in Fertility. *International Urology and Nephrology* 15:195-203.
- Patel AB, Srivastava S, Phadke RS, Govil G (1998) Arginine activates glycolysis of goat epididymal spermatozoa: an NMR study. *Biophys J* 75:1522–1528.
- Pérez R, López A, Castrillejo A, Bielli A, Laborde D, Gastel T (1997) Reproductive seasonality of corriedale rams under extensive rearing condition. *Acta Vet Scand*

38:109–117.

- Pintado B, de la Fuente J, Roldan ER (2000) Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J Reprod Fertil* 118:145-52.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester LC (1994) Melatonin – a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann NY Acad Sci* 738:419–420.
- Ptak G, Loi P, Dattena M, Tischner M, Cappai P (1999) Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability of prepubertal oocytes. *Biol Reprod* 61:1568-1574.
- Ptak G, Matsukawa K, Palmieri C, Della Salda L, Scapolo PA, Loi P (2006) Developmental and functional evidence of nuclear immaturity in prepubertal oocytes. *Hum Reprod* 21:2228-2237.
- Reddy JM, Audhya TK, Goodpasture JC, and Zaneveld LJD (1982) Properties of a highly purified antifertility factor from human seminal plasma. *Biol Reprod* 27:1076-1083.
- Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan DX (2013) Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci* 14:7231-72.
- Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM (2009) Melatonin and reproduction revisited. *Biol Reprod* 81:445–456.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E (2000) Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 7:444-58.
- Reyes A, Oliphant G, Brackett BG (1975) Partial purification and identification of a reversible decapacitation factor from rabbit seminal plasma. *Fertil Steril* 26:148-157.
- Robertson SA (2010) Immune regulation of conception and embryo implantation-all about quality control? *J Reprod Immunol* 85:51–57.
- Rodríguez CM, Labus JC, Hinton BT (2002) Organic cation/carnitine transporter, OCTN2, is differentially expressed in the adult rat epididymis. *Biol Reprod* 67:314-9.
- Rodríguez-Martinez H, Kvist U, Saravia F, Wallgren M, Johannisson A, Sanz L, Pena FJ, Martínez EA, Roca J, Vázquez JM, Calvete JJ (2009) The physiological roles of the boar ejaculate. In *Control of Pig Reproduction VIII*, H Rodríguez-Martinez, JL Vallet, AJ Ziecik (eds). Nottingham, UK, Nottingham University Press :1–21.
- Rodríguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Martínez EA, Sanz L, Roca J, Vázquez JM, Calvete JJ (2010) Spermadhesin PSP-I / PSP-II heterodimer induces migration of polymorphonuclear neutrophils into the uterine cavity of the sow. *J Reprod Immunol* 84:57–65.
- Rodríguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Roca J, Pena FJ (2008) Influence of seminal plasma on the kinematics of boar spermatozoa during freezing. *Theriogenology* 70:1242–1250.
- Rodríguez-Martinez H, Saravia F, Wallgren M, Tienthai P, Johannisson A, Vázquez JM, Martínez E, Roca J, Sanz L, Calvete JJ (2005) Boar spermatozoa in the oviduct. *Theriogenology* 63:514–535.

- Ruiz-Pesini E, Alvarez E, Enriquez JA, Lopez-Perez MJ (2001) Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *Int J Androl* 24:335–340.
- Ruwanpura SM, McLachlan RI, Meachem SJ (2010) Hormonal regulation of male germ cell development. *J Endocrinol* 205:117–131.
- Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Avarbock MR, Brinster RL (2006) Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24:1505–1511.
- Saalu LC (2010) The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence-based evaluation. *Pak J Biol Sci* 13:413–422.
- Salamone DF, Damiani P, Fissore RA, Robl JM, Duby RT (2001) Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biol Reprod* 64:1761–1768.
- Sánchez-Luengo S, Aumüller G, Albrecht M, Sen PC, Röhm K-H and Wilhelm B (2004) Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca²⁺-ATPase. *J Androl* 25:234–244.
- Santos TA, El Shourbagy S, St John JC (2006) Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril* 85:584-591.
- Sanz L, Calvete JJ, Mann K, and Gabius HJ (1993) Isolation and biochemical characterization of heparin-binding proteins from boar seminal plasma: A dual role for sperm adhesins in fertilization. *Mol Reprod Devel* 35:37-43.
- Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregón E (2009) Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:938–942.
- Semercioz A, Onur R, Ogras S, Orhan I (2003) Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuroendocrinol Lett* 24:86–90.
- Setchell BP, Hinks NT, Voglmayr JK, Scott TW (1967) Aminoacids in ram testicular fluid and semen and their metabolism by spermatozoa. *Biochemical journal* 105:1061-1065.
- Shigenaga MK, Hagen TM, Ames BN (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10771–10778.
- Shiu S, Yu Z, Chow P, Pang S (1996) Putative melatonin receptors in the male reproductive tissue. In: *Melatonin : a Universal Photoperiodic Signal with Diverse Actions*. Tang P, Pang S, Reiter R (eds). Karger, Town, pp 90-100.
- Shiu SY, Li L, Wong JT, Pang SF (1997) Biology of G protein-coupled melatonin receptors in the epididymis and prostate of mammals. *Chin Med J* 110:648–655.
- Shivaji S, Bhargava PM, and Scheit KH (1984) Immunological identification of seminal plasmin in tissue extracts of sex glands of bull. *Biol Reurod* 30:1237-1241.
- Sirotkin AV, Schaeffer HJ (1997) Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *J Endocrinol* 154:1–5.
- Smith JF, Parr J, Smith JK, Briggs RM and Duganzich DM (1997) Seasonal patterns in

production and quality of semen of rams from flocks selected for or against an early breeding season. Proc N Z Soc Anim Reprod 57:259.

- Somfai T, Inaba Y, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi S, Konishi K, Imai K (2010) Relationship between the length of cell cycles, cleavage pattern and developmental competence in bovine embryos generated by in vitro fertilization or parthenogenesis. J Reprod Dev 56:200-207.
- Stewart BL, Roser JF (1998) Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. Domest Anim Endocrinol 15:129–139.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves PB, Wolf E (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. Biol Reprod 64:904-909.
- Stradaioli G, Genevieve A, Magistrini M (2001) Evaluation of lipid peroxidation by thiobarbituric acid test in equine spermatozoa. Proceedings of the Third International Symposium on Stallion Reproduction. Fort Collins (CO)
- Strzezek J (2002) Secretory activity of boar seminal vesicle glands. Reprod Biol 2:243–266.
- Strzezek J, Saiz-Cidoncha F, Wysocki P, Tyszkiewicz A and Jastrzebski M (2002) Seminal plasma proteins as markers of biological value of boar semen. Anim Sci 20:255–266.
- Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S (2011) Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. J Pineal Res 50:310-8.
- Tanemura K, Kurohmaru M, Kuramoto K, Hayashi Y (1993) Age-related morphological changes in the testis of the BDF1 mouse. J Vet Med Sci 55:703–10.
- Tenover JS, McLachlan RI, Dahl KD, Burger HG, de Kretser DM, Bremner WJ (1988) Decreased serum inhibin levels in normal elderly men: evidence for a decline in Sertoli cell function with aging. J Clin Endocrinol Metab 67:455-9.
- Thomas CJ, Anbazhagan V, Ramakrishnan M, Sultan N, Surolia I and Swamy MJ (2003) Mechanism of membrane binding by the bovine seminal plasma protein, PDC-109: a surface plasmon resonance study. Biophys J 84:3037–3044.
- Tomek W, Torner H, Kanitz W (2002) Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes in vitro. Reprod Domest Anim 37: 86-91.
- Töpfer-Petersen E (1999) Molecules on sperm's route to fertilization. J Exp Zool 285:259–266.
- Töpfer-Petersen E, Ekhlas-Hundrieser M, Kirchhoff C, Leeb T, Sieme H (2005) The role of stallion seminal proteins in fertilization. Anim Reprod Sci 89:159–170.
- Turner RM (2003) Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? J Androl 24:790–803.
- Urrego R, Rodriguez-Osorio N, Niemann H (2014) Epigenetic disorders and altered in

gene expression after use of Assisted Reproductive Technologies in domestic cattle. *Epigenetics* 9.

- Van Blerkom J (2011) Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 11:797-813.
- Van Blerkom J, Davis PW, Lee J (1995) ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 10:415-424.
- van Overveld F, Haenen G, Rhemrev J, Vermeiden J, Bast A. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico-Biological Interactions* 127 (2000) 151–161.
- Van Vuuren RJ, Pitout MJ, van Aswegen CH, Theron JJ (1992) Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clin Biochem* 25:125–127.
- Vaz FM, Wanders RJ (2002) Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* 361:4417–429.
- Villemure M, Lazure C and Manjunath P (2003) Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from goat seminal plasma. *Reprod Biol Endocrinol* 1:39.
- Volpe S, Leoci R, Aiudi G, Lacalandra GM (2009) Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. *Reprod Domest Anim* 44:275–278.
- Wang C, Leung A, Sinha-Hikim AP (1993) Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology* 133:2773–81.
- Wang X, Sharma RK, Sikka SC, Thomas AJ, Jr Falcone T, Agarwal A (2003) Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 80:531–535.
- Wassarman PM, Kinloch RA (1992) Gene expression during oogenesis in mice. *Mutat Res* 296:3–15.
- Westermeier R (2001) *Electrophoresis in practice*. Third edition Wiley- VCH, ISBN,3-527-30300-6, Weinheim, Germany.
- Wilding M, Dale B, Marino M, di Matteo L, Alviggi C, Pisaturo ML, Lombardi L, De Placido G (2001) Mitochondrial aggregation patterns and activity in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod* 16:909-917.
- Wilkins M, Appel R, Van Eyk J, Chung M, Gorg A, Hecker M, Huber L, Langen H, Link A, Paik Y, Patterson S, Pennington S, Rabilloud T, Simpson R, Weiss W and Dunn (2006) Guidelines for the next 10 years of proteomics. *Proteomics* vol. 6 pp.4-8.
- Wilm M and Mann M (1996) Analytical properties of the nanoelectrospray ion source. *Anal Chem* 68:1.
- Wilm M, Shevchenko A, Houthaeve T, Breit S, Schweigerer L, Fotsis T, Mann M (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nanoelectrospray mass spectrometry. *Nature* 379:466.
- Wu H, He CL, Fissore RA (1997) Injection of a porcine sperm factor triggers calcium oscillations in mouse oocytes and bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development* 46:176–189.

- Zhang A, Sun H, Wang X (2012) Serum metabolomics as a novel diagnostic approach for disease: a systematic review. *Anal Bioanal Chem* 404:1239–1245.
- Zinellu A, Pasciu V, Sotgia S, Scanu B, Berlinguer F, Leoni G, Succu S, Cossu I, Passino ES, Naitana S, Deiana L, Carru C (2010) Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for ATP quantification in spermatozoa and oocytes. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398:2109-2116.
- Zúniga O, Forcada F, Abecia JA (2002) The effect of melatonin implants on the response to the male effect and on the subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. *Anim Reprod Sci* 72:165–174.