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 (XXVI CICLO)**

(coordinatore: prof. Sergio Ledda)

INFLUENZA DELLA MELATONINA SULLA RIPRODUZIONE DELLA SPECIE OVINA

Docente Guida

Prof. Salvatore Naitana

Direttore

Prof. Sergio Ledda

Tesi di dottorato del

Dr. Maria Elena Manca

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

INDICE

1. SCOPO DELLA TESI 1

2. INTRODUZIONE 2

2.1 STAGIONALITA'RIPRODUTTIVA 4

2.2 FUNZIONE DELLA MELATONINA 6

2.2.1 Biosintesi, catabolismo e regolazione della melatonina 6

2.3 RUOLO BIOLOGICO DELL'ORMONE 8

2.4 Ruolo della kisspeptina nella riproduzione. 14

2.5 BIBLIOGRAFIA 15

3. 1° esperimento: Influenza della Melatonina sulla qualità degli embrioni ovini prodotti in vitro dopo scongelamento. 20

3.1 INTRODUZIONE 20

3.2 MATERIALI E METODI 22

3.2.1 PRODUZIONE EMBRIONALE IN VITRO 22

3.2.2 Vitrificazione degli embrioni 24

3.2.3 Determinazione del trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) nel plasma sanguigno e nei media di coltura 26

3.2.4 VITALITA' E NUMERO CELLULARE TOTALE 27

3.2.5 DETERMINAZIONE DELLO STATO OSSIDATIVO 28

3.2.6 ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA (TUNEL TEST) 29

3.2.7 ESTRAZIONE E MISURAZIONE DELL'ATP INTRACELLULARE 31

3.2.8 ANALISI STATISTICA 32

3.3 RISULTATI 33

3.3.1 Determinazione del trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) nei media di coltura 33

3.3.2 VITALITA' E NUMERO CELLULARE TOTALE 35
3.3.3 DETERMINAZIONE DELLO STATO OSSIDATIVO 36
3.3.4 ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA (TUNEL TEST) 36
3.3.5 MISURAZIONE DELL'ATP INTRACELLULARE 38
3.4 DISCUSSIONE 39

4. 2° ESPERIMENTO: Effetto delle MELATONINA sull'attività ovarica in pecore pinealectomizzate 51
4.1 INTRODUZIONE 51
4.2 MATERIALI E METODI 52
4.2.1 PROTOCOLLO SPERIMENTALE 52
4.2.2 PROCEDURA CHIRURGICA 53
4.2.3 Valutazione morfometrica dei follicoli e dinamica di accrescimento del corpo luteo 55
4.2.4 Dosaggio ELISA del progesterone 56
4.2.5 DOSAGGIO DELLA MELATONINA NEL PLASMA 57
4.2.6 Determinazione della capacità antiossidante totale nel plasma 57
4.2.7 ANALISI STATISTICA 58
4.3 RISULTATI 60
4.4 DISCUSSIONE 67
4.5 BIBLIOGRAFIA 71

5. 3° ESPERIMENTO: AZIONE DEGLI IMPIANTI DI MELATONINA SUI PARAMETRI RIPRODUTTIVI IN UN GRUPPO DI ARIETI CON BASSA QUALITÀ SPERMATICA 79
5.1 INTRODUZIONE 79
5.2 MATERIALI E METODI 82
5.2.1 Valutazione della funzionalità spermatica 83

5.2.2 Diluizione e congelamento del materiale seminale 87
5.2.3 TEST SVILUPPO IN VITRO 88
5.2.4 IMPIANTO DI MELATONINA 90
5.2.5 Determinazione della capacità antiossidante totale nel plasma 90
5.2.6 Dosaggio ELISA testosterone e prolattina 91
5.3 ANALISI STATISTICA 92
5.4 RISULTATI E DISCUSSIONE 93
5.5 CONCLUSIONI 107
5.6 BIBLIOGRAFIA 109

1. SCOPO DELLA TESI

Attraverso questo lavoro si sono volute porre in evidenza le diverse caratteristiche che riguardano la melatonina. Ci siamo occupati della funzione di questa indolamina, in particolare, rapportandola al campo della riproduzione nella specie ovina ed in particolare ne abbiamo sperimentato 3 diversi aspetti:

1) dell'effetto dell'ormone pineale come azione antiossidativa sulla ripresa dell'attività metabolica degli embrioni sottoposti a crioconservazione;
2) l'influenza della pinealectomia sulla funzionalità ovarica di un gruppo di pecore nel corso di un intero anno e della influenza della totale assenza dell'ormone sull'andamento del ciclo sessuale;
3) sull'effetto di carattere terapeutico determinato dall'impianto sottocutaneo dell'ormone in un gruppo di arieti che manifestavano limitati parametri riproduttivi

2. INTRODUZIONE

Nel corso di questi ultimi decenni, l'incessante e qualificata attività di ricerca svolta da svariati laboratori ha permesso di acquisire una serie di preziose informazioni sull'attività riproduttiva delle principali specie animali. Questo progresso scientifico ha accresciuto l'interesse e la volontà di molti operatori ad investire nuove risorse nel campo dell'allevamento animale ed in particolare nel miglioramento delle capacità produttive delle razze animali di rilevante impatto zootecnico attraverso programmi di selezione genetica.

L'attuazione dei programmi di selezione degli animali presenta diversi ostacoli, i maggiori riguardano i limiti che le diverse specie animali mostrano allorché si proceda alla intensificazione del ritmo riproduttivo. L'accelerazione del ritmo riproduttivo di una razza o anche di un singolo animale, secondo i genetisti, rappresenta la base di partenza per la realizzazione di un buon programma di selezione. Ovviamente queste limitazioni sono ancora presenti in diverse specie animali e rappresentano una sorta di retaggio ancestrale frutto della capacità di adattamento che l'animale si è guadagnato per poter sopravvivere nel corso del processo di selezione naturale.

Questi limiti sono rappresentati dalla stagionalità riproduttiva che contraddistingue alcune specie di piccoli ruminanti come la capra e la pecora. L'attività riproduttiva, limitata ad una sola stagione per anno, rappresenta il riuscito processo di selezione dell'animale e né ha determinando il suo felice inserimento nell'ambiente naturale. La stagionalità riproduttiva significa che un animale svolge la propria funzione fisiologica non disgiunta dal contesto ambientale nel quale è inserito ma anzi ne risulta esso stesso componente attiva.

Ecco che in alcuni periodi dell'anno entrambi i sessi intraprendono l'attività riproduttiva seguita, dopo l'accoppiamento e la fecondazione, dalla fase di gravidanza che porta la femmina a ritrovarsi nel momento dell'allattamento, quando le richieste energetiche risultano le più elevate per l'organismo, in un periodo di grande disponibilità di risorse energetiche.

Mettendo a confronto le due specie animali (ovina e caprina) si osserva che grazie alle sue caratteristiche comportamentali l'ovino ha subito maggiormente l'opera di addomesticamento da parte dell'uomo e ciò è in relazione al fatto che la capra mal si adatta alle condizioni di allevamento intensivo maggiormente impiegato nell'allevamento degli

animali per ragioni di carattere economico.

Ciò detto appare naturale che i caprini abbiano mantenuto maggiormente i caratteri ancestrali rispetto invece alla pecora e fra questi la stagionalità riproduttiva appare più evidente nella capra rispetto alla pecora.

2.1 STAGIONALITA'RIPRODUTTIVA

Da una semplice osservazione si evince che tutti gli individui appartenenti alle diverse specie animali svolgono un intensa attività giornaliera finalizzata all'acquisizione del massimo indice di "idoneità" cioè della capacità degli individui di lasciare in eredità i propri geni.

In un singolo atto riproduttivo un individuo trasmette in eredità solo il 50% dei propri geni, per cui per accrescere la propria idoneità un individuo deve riprodursi il maggior numero di volte ed in tal caso riduce la perdita dei propri geni. Le strategie che gli animali hanno adottato per trasmettere il più possibile i propri geni sono basate ovviamente sui sistemi di riproduzione. Alcune specie producono solo poche cellule uovo, in alcuni casi come per l'equino, bovino e per i piccoli ruminanti una soltanto. Inizialmente l'investimento parentale è molto limitato ma andrà in crescendo fino alla fase di allattamento; altre specie adottano invece la strategia di investire la gran parte delle loro risorse producendo un numero elevato di cellule uovo ma abbandonando le stesse alle condizioni ambientali. La prima strategia è più lenta ma meno rischiosa. Ovviamente è necessario riprodursi ma è altrettanto necessario fare in modo che a sua volta il nuovo nato possa anch'esso riprodursi. Per realizzare tutto ciò è necessario che l'atto riproduttivo si inserisca in un contesto favorevole che né permetta la sua completa realizzazione. Da qui la capacità operata dagli animali di sviluppare strategie riproduttive in grado di accrescere il proprio grado di idoneità. Ecco che l'andamento differente della luce, della temperatura e della umidità in definitiva l'attività climatica influenza pesantemente la produzione delle piante e quindi la disponibilità energetica.

Gli animali che si inseriscono in modo sincrono con questi eventi avranno maggiore possibilità di successo riproduttivo e di conseguenza maggiore idoneità e maggiore affermazione dei propri geni. Ecco che in relazione alla durata della gravidanza gli animali si riproducono maggiormente in alcuni periodi dell'anno per avere una buona disponibilità energetica nella stagione più ricca: la primavera. In tal modo le opportunità di sopravvivenza del piccolo si accrescono e di conseguenza anche l'idoneità dei genitori. Naturalmente la domanda da porsi è come l'animale legge il ciclico alternarsi delle stagioni.

Ebbene la risposta è stata trovata in un ormone il cui livello indicherà il ciclico

alternarsi delle stagioni. L'ormone in questione è la melatonina un indolamina secreta prevalentemente dalla ghiandola pineale e che permette all'animale di leggere le differenze caratteristiche autunno-invernali da quelle primaverili-estive.

2.2 FUNZIONE DELLA MELATONINA

La melatonina è una molecola molto diffusa in natura. È sufficiente affermare che è presente nei batteri, organismi unicellulari eucarioti, nelle macroalghe, in molte parti di piante a più di 20 mono e dicotilenodi, in molte specie di invertebrati e vertebrati [12;3]. La melatonina trova largo impiego nella medicina cinese con più di 60 citazioni contenute in erbe medicinali indicate per la cura dell'invecchiamento [4]. La molecola inoltre è presente in elevate quantità in piante dell'area alpina e mediterranea che sono esposte ad alti livelli di raggi UV. La melatonina svolge diverse azioni fisiologiche segnalando non solo il momento del giorno e dell'anno ma anche svolgendo un azione citoprotettiva come antiossidante, un'azione antioncotica ed immunomodulatrice, ha azione ipnotica ed antidepressiva, interviene sul metabolismo osseo e delle affezioni cardiovascolari ed infine sulla maturazione sessuale e regolazione dell'attività riproduttiva.

2.2.1 Biosintesi, catabolismo e regolazione della melatonina

Il precursore della melatonina è costituito dal triptofano che viene assunto dal sangue e mediante l'intervento dell'enzima 5-idrossitriptofano viene convertito a serotonina. Questa molecola che ha implicazione sull'attività degli individui e sulla riproduzione, viene trasformata in acetil serotonina che rappresenta la molecola limitante la sintesi della melatonina e infine in seguito all'azione di una idrossiindole metiltransferasi viene convertita a melatonina. La sintesi avviene a livello della ghiandola pineale mediante un attività ritmica circadiana con un alto livello durante la notte ed un basso livello durante il giorno [5;6;7]. Tuttavia la capacità di sintesi dell'ormone è presente anche in altri distretti e fra questi il tratto gastro-intestinale ha un ruolo di primo piano mostrando livelli di melatonina centinaia di volte superiori alla ghiandola pineale.

La regolazione biosintetica della melatonina da parte della pineale viene mediata dal tratto retino-ipotalamico che proietta gli impulsi proveniente dalla retina al nucleo soprachiasmatico. Speciali foto-recettori retinici, contenenti la melapsina sono coinvolti in

questa proiezione. Attraverso il nucleo paraventricolare, le fibre passano dal SNC e mediante una serie di tappe intermedie arrivano alle fibre simpatiche pregangliari del ganglio cervicale superiore. Le fibre del ganglio cervicale superiore terminano successivamente sui pinealociti della epifisi e regolano, mediante la liberazione di nor-adrenalina, la liberazione della melatonina. Il rilascio della nor-adrenalina avviene durante la notte, la nor-adrenalina si lega ad un recettore beta adrenergico che attivando l'adenilciclasi innesca la reazione a cascata nella cellula mediante un sistema delle Gs proteine. Durante il giorno l'attività elettrica del SNC è elevata ed in queste condizioni il rilascio della nor-adrenalina è limitata. La liberazione della melatonina è inoltre influenzata da una serie di neuropeptidi che potenziano l'azione della nor-adrenalina come il VIP e il neuropeptide Y [7;8;9;10].

La melatonina, in relazione alla sua liposolubilità è quindi in grado di attraversare liberamente le membrane plasmatiche, non viene stoccata nella pineale ma viene immediatamente liberata nel SNC e nel circolo ematico raggiungendo in pochi istanti tutti i tessuti dell'organismo. La concentrazione nel liquido cerebro spinale è circa 20-30 volte superiore rispetto al sangue. L'inattivazione della molecola appare molto rapida con due emivite, la prima dopo appena 2 minuti e l'altra dopo 20 minuti. La melatonina in circolo viene principalmente metabolizzata a livello epatico dove subisce una prima idrossilazione in posizione C6 dal citocromo P450 mono-ossigenasi, successivamente viene coniugata con solfati per essere poi escreta come 6-sulfatossimelatonina; subisce anche la glucuronazione ma in misura molto limitata [11].

L'azione della melatonina viene mediata dai due recettori MT1 e MT2 che sono i principali responsabili dell'effetto cronobiologico dell'ormone; il MT2 agisce principalmente mediante l'induzione della fase di cambiamento, mentre il MT1 su quella d'innesco. Esiste un terzo sito di legame che viene principalmente impiegato contro gli stress ossidativi ed è mediato dall'enzima chinone redutasi; ancora il legame con i recettori per l'acido retinico ROR modula invece alcuni aspetti immunomodulatori. È probabile che la diretta inibizione del passaggio della melatonina attraverso la membrana mitocondriale lascia intendere che anche su questo organulo citoplasmatico svolga la sua azione direttamente sulla catena respiratoria.

2.3 RUOLO BIOLOGICO DELL'ORMONE

Come fattore antioncotico.

Sono state riscontrate evidenze sperimentali che l'avvio, la crescita e la progressione di un tumore può essere limitata dal livello ematico di melatonina prodotta durante la notte. In prevalenza l'azione della melatonina, che deve essere somministrata a dosi fisiologiche o farmacologiche, si sviluppa su cellule tumorali estrogeno-dipendenti. L'azione positiva della melatonina è stata osservata in particolare su svariati tumori cellulari includendo il carcinoma ovario ed uterino, i melanomi, i tumori della prostata e quelli a carico del tratto intestinale. La somministrazione della melatonina migliora inoltre anche l'attività dei soggetti con tumori non sensibili all'ormone. Il meccanismo d'azione dell'ormone non è stato completamente spiegato ma si ritiene che l'azione antiossidante e limitante i radicali liberi potrebbe svolgere un ruolo determinate [12].

Come molecola immunomodulatrice.

Eleganti studi sperimentali condotti sul topo hanno messo in evidenza che il blocco della sintesi di melatonina determina una diminuzione della risposta immunitaria sia umorale che cellulare. Inoltre la somministrazione di melatonina protegge i topi verso malattie virali a carico dell'encefalo. L'azione positiva dell'ormone si esplica anche a livello del midollo rosso delle ossa proteggendolo e preservando le cellule staminali da insulti esterni. L'azione della melatonina sul sistema immunitario provoca un incremento nella produzione di interleukina 2 e 6 in monociti e macrofagi coltivati in vitro. Sono stati messi in evidenza inoltre siti di legame dell'ormone sulle cellule del tessuto linfoideo che implicano in modo chiaro il coinvolgimento diretto dell'indolamina. Da alcuni è stata suggerito inoltre che un ulteriore attività dell'ormone pineale potrebbe essere svolta anche come azione antiapoptotica. È stato osservato che il livello della melatonina durante la notte è direttamente correlata con la ritmicità dei linfociti T-helper [13].

Come molecola ipnotica.

Come è noto la melatonina promuove un azione di riposo negli animali ad attività diurna in relazione al fatto che la molecola viene prodotta durante la notte. Tale attività viene mediata dai recettori MT1 che sono prevalentemente presenti nel SNC. L'ingestione di 1-3 mg di melatonina durante il giorno incrementa il livello circolatorio dell'ormone ed induce sonnolenza in soggetti normali. Per tale azione l'ormone viene consigliato nelle forme d'insonnia ma anche come co-adiuvante nei trattamenti ipnotici con benzodiazepine determinando un incremento del riposo sia in termini di durata che di sonno ristoratore. Non tutte le prove sperimentali hanno dato risultati similari, la differenze potrebbe essere data dal fatto che i risultati positivi della somministrazione dell'ormone vengono acquisiti in particolare negli individui che mostrano livelli circolatori dell'ormone molto bassi mentre nessun beneficio è stato evidenziato nei soggetti con valori dell'indolamina elevati. Sempre nella specie umana sembra tuttavia abbastanza assodato che l'impiego dell'ormone nei casi d'insonnia riferibili a persone di una certa età risulti essere consigliabile. La molecola svolge un ruolo importante anche nella sindrome depressoria. La somministrazione di agomelatina, un selettivo antagonista per i recettori MT1 e MT2 è risultato particolarmente attivo in condizioni di profonda depressione di diverse specie animali. Sempre in questa direzione, è stato osservato che la melatonina svolge un influenza positiva anche sulla condizione mentale [14].

Come molecola crono biotica.

Sempre partendo dalla constatazione che la melatonina viene prodotta di notte si è pensato che la sua somministrazione in soggetti con disturbi sul ritmo circadiano potesse determinare effetti positivi. Ebbene prove sperimentali in tal senso hanno confermato positivamente tale ipotesi ed il suo utilizzo in determinate condizioni migliora l'attività umana. In particolare si è osservato l'effetto positivo dell'ormone nei soggetti con turni di lavoro notturni che mostrano alterazioni nella produzione di melatonina, nel ritmo sonno-

veglia e nella risposta alla fatica. In questi soggetti si assiste ad una sorta d'inversione dell'attività dell'individuo e nei ritmi sonno-veglia. Un ulteriore impiego positivo della melatonina è stato evidenziato nella sindrome del cosiddetto "jet lag" cioè il mancato adattamento ai nuovi ritmi circadiani. È un fenomeno che risulta manifesto in persone che sono costrette a spostarsi con voli aerei da un continente all'altro modificando i propri ritmi biologici. La somministrazione della melatonina in questi soggetti permette di superare questi inconvenienti e li aiuta a reinserirsi nel nuovo ritmo circadiano. La somministrazione dell'ormone in soggetti con sindrome da "jet lag" ha evidenziato il pronto ripristino dei soggetti che avevano mostrato sonnolenza diurna e riduzione del livello di concentrazione. L'impiego dell'ormone si è dimostrato più efficace se comparato ad altri due prove come l'esposizione alla luce e l'attività fisica, per diminuire l'effetto del "jet lag" in atleti in procinto di svolgere gare sportive [15;16;17;18].

Come molecola antiulcera.

La melatonina non solo è presente nel tratto intestinale ma è anche secreta dalle cellule enterocromaffini. Il significato della sintesi dell'ormone è stato per diverso tempo un aspetto che ha incuriosito diversi ricercatori. L'ormone viene rilasciato in risposta all'arrivo del cibo dallo stomaco e, mediante il recettore MT2, stimola la liberazione del bicarbonato. È stata riscontrata una correlazione negativa fra l'incidenza dell'ulcera e il livello della melatonina in suinetti sottoposti a situazione stressanti di allevamento. Nell'uomo si è riscontrato una esacerbazione dell'ulcera in individui con bassi livelli di melatonina. È probabile che l'effetto positivo di gastro-protezione dell'indolamina nel tratto intestinale possa derivare dalla sua azione antiossidativa svolta nei confronti delle cellule. La melatonina esprima anche valori abbastanza alti nella bile e questi valori vengono spiegati come una ulteriore protezione della molecola verso le cellule intestinali nei confronti degli acidi biliari [19].

Come molecola antipressoria.

Evidenze recenti hanno mostrato come la melatonina influenza l'attività cardiaca e la pressione ematica nella specie umana. La somministrazione dell'indolamina incrementa l'attività vagale cardiaca e riduce contemporaneamente il livello circolatorio di nor-adrenalina. L'azione del vago sul cuore è di frenarne l'attività diminuendo la forza di contrazione, la velocità di trasmissione, il periodo di refrattarietà e la frequenza cardiaca. La somministrazione di 1 mg della molecola a individui ipertesi determina una riduzione della pressione sistolica e diastolica e di conseguenza la pressione media ematica. L'azione ipotensiva dell'ormone potrebbe essere mediata oltre che direttamente sul cuore anche sui vasi ematici attraverso una vasodilatazione. In tal caso l'azione risulterebbe duplice e per questo motivo viene consigliata nella terapia per l'ipertensione essenziale [20;21].

Come regolatore della massa corporea.

E' riconosciuto alla melatonina un ruolo nella spesa di energia da parte dell'organismo e nella regolazione del peso corporeo. Con l'età, il deposito dei lipidi a livello viscerale aumenta mentre diminuisce il livello della melatonina. La somministrazione dell'ormone limita la deposizione dei lipidi nei visceri e riduce il peso corporeo. L'azione dell'ormone è mediata dai recettori MT2 che si trovano nel tessuto adiposo. Tuttavia nella specie umana è possibile osservare che l'obesità non è associata a significative modificazioni del livello circolatorio di melatonina [22;23;24].

Come antagonista degli insulti ossidativi.

La scoperta che la melatonina sia in grado di bloccare l'effetto dei radicali liberi ha portato ad una serie di studi per conoscere il meccanismo d'azione. In tutte le cellule e negli spazi extracellulari, la melatonina può essere metabolizzata non per via enzimatica ma

ossidata da radicali liberi e da altri ossidanti nelle due sue forme formil 5-metossikinuramina (AFMK) e acetil 5-metossikinuramina (AMK). La via metabolica di passaggio dalla melatonina all'AFMK è in grado di consumare 4 moli di radicali liberi. I primi risultati hanno inoltre mostrato che l'ormone appare molto più attivo degli altri analoghi naturali. E' stato visto che la melatonina incrementa l'attività respiratoria mitocondriale e la sintesi dell'ATP. L'effetto della melatonina sulla catena respiratoria può costituire una nuova opportunità per la prevenzione della formazione dei radicali e per l'eliminazione dei radicali liberi già formati. Il modello proposto si configura all'interno della catena respiratoria per un ciclo di donazione di elettroni al citocromo C che potrebbe generare un radicale cationico in modo da competere, come un alternativo accettore di elettroni, con la molecola dell'ossigeno per gli elettroni e diminuire la formazione dell'anione superossido (O_2^-). Questo composto come è noto è il più pericoloso radicale libero che si forma nelle cellule ed è il responsabile principale degli insulti ossidativi. Il meccanismo di difesa della cellula è di convertire l'anione superossido ad acqua ossigenata tramite l'intervento della superossido dismutasi e successivamente bloccare questo composto tramite il glutatione cellulare. La protezione mitocondriale ad opera del AMK è stata dimostrata sperimentalmente e sviluppa la sua attività sul flusso di elettroni attraverso la catena respiratoria migliorando la sintesi dell'ATP[25;26;27;2;28]

<u>Come modulatore dell'attività riproduttiva e della maturazione sessuale</u>

In letteratura esistono numerose esperienze che testimoniano il ruolo fondamentale che la melatonina svolge nell'attività riproduttiva in particolare nelle specie condizionate dalla stagione. Come è noto un piccolo numero di neuroni presenti a livello ipotalamico è responsabile della produzione dell'ormone GnRH che attraverso il circolo portale ipotalamo-ipofisario regola la liberazione delle gonadotropine ipofisarie LH e FSH che sono gli ormoni responsabili della crescita e dello sviluppo del follicolo [29]. E' stato osservato come la melatonina influenzi pesantemente la secrezione del GnRH mediante i recettori MT1, MT2 e ROR [30].

I primi studi avevano individuato nei neuroni dell'area pre-ottica e mediobasale dell'ipotalamo il sito d'intervento dell'azione riproduttiva della melatonina. La ulteriore

dimostrazione che i recettori per la melatonina erano presenti negli organi riproduttivi e che recettori per gli ormoni sessuali delle gonadi erano presenti nell'epifisi lasciava chiaramente intendere l'esistenza di una reciproca influenza. E' stato osservato negli individui impuberi appartenenti a specie di laboratorio che la caduta del livello di melatonina nel sangue può costituire un segnale per un aumento della frequenza pulsatile del GnRH e permettere l'avvento della pubertà. Sempre nel topo, specie animale che si riproduce nei giorni lunghi, l'impianto di melatonina in questa area ipotalamica ne bloccava l'attività riproduttiva. La stessa esperienza condotta negli ovini determinava invece una ripresa dell'attività riproduttiva [31].

L'azione dell'ormone quindi appare di stimolo all'attività riproduttiva nelle specie che si riproducono nei giorni corti e di inibizione nelle specie che si riproducono nei giorni lunghi. E' certamente un mistero e non si conosce ancora come la stessa molecola possa esercitare in alcune specie un influenza negativa ed in altre all'opposto una influenza positiva. Naturalmente questi studi non possono prescindere dalla conoscenza oggi disponibile sull'attività ovarica. In questi ultimi anni si sono moltiplicati gli sforzi per approfondire le conoscenze al fine di una possibile applicazione pratica della melatonina, in particolare nelle specie di interesso zootecnico che sono da un punto di vista riproduttivo positivamente influenzate dal questo ormone.

2.4 Ruolo della kisspeptina nella riproduzione.

Come già molte volte affermato, alcune specie, come quella ovina, hanno un preciso periodo nel quale riprodursi, in maniera da garantire al proprio redo, le migliori condizioni per sopravvivere. Come conseguenza si avranno diverse durate di gestazione per ciascuna specie considerata. Per quanto riguarda la specie ovina, andrà a riprodursi dalla tarda estate sino all'inizio dell'inverno (fotoperiodo negativo). I meccanismi neuroendocrini sono mediati dalla melatonina secreta dell'epifisi in modo da far percepire all'organismo le variazioni stagionali andando ad agire a livello di ipofisi per la secrezione di gonadotropine e prolattina. Il nucloe soprachiasmatico regola la durata della secrezione della melatonina in base alla lunghezza della giornata. La melatonina, pertanto, fornisce ai suoi tessuti bersaglio un messaggio circadiano e stagionale [32]. Il ruolo centrale di questa sostanza, per quanto riguarda la stagionalità riproduttiva, è assodato da tempo, manca solamente di capire i meccanismi che la legano ai cambiamenti nella secrezione di GnRH. Questo legame è rappresentato dalla kisspeptin. Si tratta del principale stimolatore dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade; inoltre questo peptide svolge un ruolo importante in altri aspetti della fisiologia della riproduzione, a partire dall'inizio della pubertà sino all'induzione dell'ovulazione. La kisspeptin agisce a livello di neuroni per il GnRH stimolando la secrezione di quest'ultimo, andando ad innescare un incremento del rilascio di LH e, in misura minore, di FSH [33]. Il primo fattore che pone in evidenza il fatto che la kisspeptin sia coinvolta nel controllo del gene per la melatonina, è stato messo, per la prima volta, in evidenza nell'hamster siriano[34]. Infatti in questa specie, i livelli di kisspeptin nel nucleo arcuato, risultavano maggiori nel fotoperiodo crescente. Nella pecora, invece, con fotoperiodo decrescente, i livelli di questa sostanza risultavano più alti nelle giornate corte (breeding season) rispetto a quelle lunghe [35; 36].

Da quanto detto prima, si evince che, questo peptide, svolge una azione inibitoria o di attivazione dell'asse gonadica in dipendenza della specie che si considera e dallo stato fisiologico dell'individuo [33].

2.5 BIBLIOGRAFIA

1. Hardeland R & Fuhrberg B (1996) Ubiquitous melatonin. Presence and effects in unicells, plants and animals. Trends Comp Biochem Physiol 2, 25–45.

2. Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC & Qi W (2001) Biochemical reactivity of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species: a review of the evidence. Cell Biochem Biophys 34, 237–256.

3. Hardeland R & Poeggeler B (2003) Non-vertebrate melatonin. J Pineal Res 34, 233–241.

4. Chen G, Huo Y, Tan DX, Liang Z, Zhang W & Zhang Y (2003) Melatonin in Chinese medicinal herbs. Life Sci 73, 19–26.

5. Claustrat B, Brun J & Chazot G (2005) The basic physiology and pathophysiology of melatonin. Sleep Med Rev 9, 11–24. Axelrod J. (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. Science 184, 1341–1348.

6. Kelly RW, Amato F & Seamark RF (1984) N-acetyl-5-methoxy kynurenamine, a brain metabolite of melatonin, is a potent inhibitor of prostaglandin biosynthesis. Biochem Biophys Res Commun 121, 372–379

7. Axelrod J. (1974) The pineal gland: a neurochemical transducer. Science 184, 1341–1348.

8. Reppert SM, Godson C, Mahle CD, Weaver DR, Slaugenhaupt SA & Gusella JF (1995) Molecular characterization of a second melatonin receptor expressed in human retina and brain: the Mel1b melatonin receptor. Proc Natl Acad Sci USA 92, 8734–8738.

9. Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M & Carlberg C (1995) Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand. Nucleic Acids Res 23, 327–333.

10. Carlberg C (2000) Gene regulation by melatonin. Ann N Y Acad Sci 917, 387–396.

11. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C & Reiter RJ (2005) Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. J Neuroimmunol 165, 139–149.

12. Vijayalaxmi Thomas CR Jr, Reiter RJ & Herman TS (2002) Melatonin: from basic research to cancer treatment clinics. J Clin Oncol 20, 2575–2601.

13. Garcia-Maurino S, Pozo D, Carrillo-Vico A, Calvo JR & Guerrero JM (1999) Melatonin activates Th1 lymphocytes by increasing IL-12 production. Life Sci 65, 2143–2150.

14. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ & Deng MH (1994) Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. Proc Natl Acad Sci USA 91, 1824–1828.

15. Poirel VJ, Boggio V, Dardente H, Pevet P, Masson-Pevet M & Gauer F (2003) Contrary to other non-photic cues, acute melatonin injection does not induce immediate changes of clock gene mRNA expression in the rat suprachiasmatic nuclei. Neuroscience 120, 745–755.

16. Arendt J (2005) Melatonin in humans: it's about time. J Neuroendocrinol 17, 537–538.

17. Cardinali DP, Bortman GP, Liotta G, Perez LS, Albornoz LE, Cutrera RA, Batista J & Ortega GP (2002) A multifactorial approach employing melatonin to accelerate

resynchronization of sleep-wake cycle after a 12 time-zone westerly transmeridian flight in elite soccer athletes. J Pineal Res 32, 41–46

18. Dolberg OT, Hirschmann S & Grunhaus L (1998) Melatonin for the treatment of sleep disturbances in major depressive disorder. Am J Psychiatry 155, 1119–1121.

19. Bubenik GA, Ayles HL, Friendship RM, Brown GM & Ball RO (1998) Relationship between melatonin levels in plasma and gastrointestinal tissues and the incidence and severity of gastric ulcers in pigs. J Pineal Res 24, 62–66.

20. Arangino S, Cagnacci A, Angiolucci M, Vacca AMB, Longu G, Volpe A & Melis GB (1999) Effects of melatonin an vascular reactivity, catecholamine levels, and blood pressure in healthy men. Am J Cardiol 83, 1417.

21. Scheer FA (2005) Potential use of melatonin as adjunct antihypertensive therapy. Am J Hypertens 18, 1619–1620.

22. Rasmussen DD, Boldt BM, Wilkinson CW, Yellon SM & Matsumoto AM (1999) Daily melatonin administration at middle age suppresses male rat visceral fat, plasma leptin, and plasma insulin to youthful levels. Endocrinology 140, 1009–1012.

23. Prunet-Marcassus B, Desbazeille M, Bros A, Louche K, Delagrange P, Renard P, Casteilla L & Penicaud L (2003) Melatonin reduces body weight gain in Sprague Dawley rats with diet-induced obesity. Endocrinology 144, 5347–5352.

24. Brydon L, Petit L, Delagrange P, Strosberg AD & Jockers R (2001) Functional expression of mt2 (mel1b) melatonin receptors in human paz6 adipocytes. Endocrinology 142, 4264–4271.

25. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Poeggeler B, Lopez-Burillo S, Mayo JC, Sainz RM & Reiter RJ (2003) Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic

antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. J Pineal Res 34, 249–259.

26. Matuszak Z, Reszka K & Chignell CF (1997) Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. Free Radic Biol Med 23, 367–372.

27. Stasica P, Ulanski P & Rosiak JM (1998) Melatonin as a hydroxyl radical scavenger. J Pineal Res 25, 65–66.

28. Acuña-Castroviejo D, Escames G, Leon J, Carazo A & Khaldy H (2003) Mitochondrial regulation by melatonin and its metabolites. Adv Exp Med Biol 527, 549–557.

29. Tamarkin L, Baird CJ & Almeida OF (1985) Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? Science 227, 714–720.

30. Malpaux B, Tricoire H, Mailliet F, Daveau A, Migaud M, Skinner DC, Pelletier J & Chemineau P (2002) Melatonin and seasonal reproduction: understanding the neuroendocrine mechanisms using the sheep as a model. Reprod Suppl 59, 167–179.

31. Barrell GK, Thrun LA, Brown ME, Viguie C & Karsch FJ (2000) Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the Ewe. Biol Reprod 63, 769–774.

32. Goldman BD (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. J. Biol. Rhythms 16, 283-301

33. Beltramo M, Dardente H, Cayla X & Caraty A (2013) Cellular mechanisms and integrative timing of neuroendocrine control of GnRH secretion by Kisspeptin. Mol. Cell. Endocrinol. 382, 387-399

34. Revel FG, Saboureau M, Masson-Pevet M, Pevet P, Mikkelsen JD, Simonneaux V (2006) Kisspeptin mediates the photoperiodic control of reproduction in hamsters. Curr. Biol. 16, 1730-1735.

35. Smith JT, Clay CM, Caraty A & Clarke IJ (2007) Kiss-1 messenger ribonucleic acid expression in the hypothalamus of the ewe is regulated by sex steroids and season. Endocrinology 148, 1150-1157

36. Wagner GC, Johnston JD, Clarke IJ, Lincoln GA & Hazlerigg DG (2008) Refining the limits of day lentgh responsiveness in a seasonal mammal. Endocrinology 149,32-39

3. 1° ESPERIMENTO: INFLUENZA DELLA MELATONINA SULLA QUALITÀ DEGLI EMBRIONI OVINI PRODOTTI IN VITRO DOPO SCONGELAMENTO.

3.1 INTRODUZIONE

La capacità di crioconservare embrioni con una limitata perdita di vitalità è essenziale per garantire il successo delle tecnologie di riproduzione assistita. Allo stesso modo, la crioconservazione va a ridurre del 30-40% la capacità di impianto dell' embrione [1]. La sopravvivenza dell' embrione al congelamento viene misurata tramite la riespansione della cavità blastocelica di quest'ultimo in seguito allo scongelamento e le percentuali di gravidanza ottenute dopo trasferimento su riceventi. Entrambi questi parametri esprimono percentuali inferiori negli embrioni prodotti in vitro (IVP) rispetto a quelli vivo-derivati.[2,3] Anche se la causa di questa differenza non è completamente nota, sembra che le differenze di qualità tra gli embrioni in vivo e in vitro sia dovuta alla diversa proporzione tra lipidi e proteine, che potrebbe, almeno in parte, spiegare la minore crio-resistenza degli embrioni IVP.[3] Inoltre è stato riportato che l' ovidotto fornisce all'embrione l'ambiente ottimale di ossido riduzione [4], mentre in vitro le condizioni di coltura vanno ad alterare l' omeostasi ossidativa [5,6] per un aumento dell' esposizione ai ROS o per una diminuzione della protezione antiossidante, con conseguente bassa qualità dell' embrione.

Lo stress ossidativo che ne consegue risulta implicato in tutta una serie di danni a livello cellulare quali: perossidazione dei lipidi di membrana, ossidazione degli amminoacidi e degli acidi nucleici, apoptosi e necrosi con conseguente diminuzione della vitalità dell' embrione IVP[7,8]. Considerando che la crioconservazione promuove l'accumulo di ROS[7,9], e che gli embrioni vitrificati diventano molto sensibili agli effetti deleteri dei ROS [10,11], l'importanza della detossificazione dai ROS sembrerebbe giocare un ruolo chiave nella capacità delle blastocisti di ripristinare la loro funzione metabolica dopo lo scongelamento.

Lo stress ossidativo provoca una perdita di equilibrio tra la produzione di ROS e la capacità antiossidante delle cellule [12]. Gli antiossidanti possono provocare effetti benefici in questo bilanciamento perché la somministrazione di questi ultimi decresce lo stress

ossidativo e l'apoptosi cellulare migliorando lo sviluppo di embrioni IVP nei mammiferi [11].

La melatonina è un potentissimo scavenger dei radicali liberi e antiossidante e rispetto agli altri antiossidanti, quest' indolamina è multifunzionale ed universale. Allo stesso modo, i suoi metaboliti partecipano nell' interazione con i ROS. Questo fenomeno viene riferito come reazione a cascata di scavenger [13]. Inoltre, grazie a questa sua diretta interazione con i ROS, la melatonina va a stimolare l' attività di altri enzimi antiossidanti come la superossidodismutasi (SOD), la glutatione perossidasi (GPx), e la catalasi (CAT) [14,16]. Per le sue molteplici capacità antiossidanti, la melatonina previene la perossidazione dei lipidi [58,59], delle proteine [60] e il danno a livello di DNA [17,18]. nella Inoltre può svolgere funzione di prevenzione dell' omeostasi e della funzionalità ottimale dei mitocondri andando a ridurre e prevenire lo stress ossidativo mitocondriale [19], e limitando i conseguenti eventi apoptotici e di morte cellulare [20].

Diverse ricerche hanno inoltre dimostrato che la melatonina sembra migliorare la produzione embrionale in varie specie, come quella bovina [27,29], suina [30,31], ma anche nel topo[21,24] e nel bufalo. Aggiungendo melatonina (10 -9 M) al medium di coltura negli embrioni a due cellule di topo prodotti in vivo e vitrificati è stato notato un aumento dei livelli intracellulari di glutatione (GSH) con una riduzione dei ROS. Questi cambiamenti hanno portato ad una riduzione dell'apoptosi nelle blastocisti, e ad un numero medio cellulare di apoptosi per blastocisti vitrificate in embrioni a due cellule [23]. Dunque, la melatonina potrebbe facilitare negli embrioni vitrificati la detossificazione dai ROS dopo scongelamento. Questa azione potrebbe essere particolarmente efficace per gli embrioni IVP crioconservati, considerando la loro ridotta criotolleranza.

In questo lavoro, la melatonina viene aggiunta a diverse concentrazioni nel medium di coltura del post scongelamento di blastocisti di ovino prodotte in vitro e in seguito vitrificate. Esponendo, quindi, gli embrioni a condizioni di coltura differenti e capacità antiossidanti totali. In seguito si è andati a valutare la vitalità embrionale, la conta totale delle cellule, la frammentazione del DNA, il contenuto intracellulare di ATP e lo stato ossidativo.

3.2 MATERIALI E METODI

3.2.1 PRODUZIONE EMBRIONALE IN VITRO

La raccolta degli oociti è stata effettuata da ovaie di ovini adulti (2-6 anni) regolarmente macellati. Immediatamente dopo il prelievo, le ovaie venivano poste in una soluzione salina tamponata (PBS, Sigma) addizionata di antibiotici (penicillina e streptomicina 5 mg/100 ml) e trasferite in laboratorio entro 1 ora dal prelievo. Il recupero degli oociti è avvenuto seguendo una tecnica già da tempo utilizzata nel nostro laboratorio; dopo essere state lavate per due volte in PBS le ovaie venivano dissezionate per l'isolamento dei follicoli. Tutte queste operazioni sono state eseguite a temperatura ambiente sotto una cappa a flusso laminare. Dai follicoli così dissezionati veniva liberato l'oocita mediante rottura della parete follicolare con un ago di 18 gauge in una piastra petri contenente medium di dissezione costituito da TCM 199 contenente Hepes per stabilizzare il pH, antibiotici, e 0.1% di alcool polivinilico come macromolecola inerte. I complessi cumulo-oocita presenti nel medium venivano selezionati in relazione ad alcune caratteristiche morfologiche e strutturali. Sono stati infatti selezionati solo quelli provvisti di almeno 4 strati di cellule della granulosa, con citoplasma uniforme e omogenea distribuzione dei lipidi. Dopo essere stati lavati in medium di dissezione per 2 volte sono stati sottoposti a maturazione in vitro per il completamento della meiosi.

Le condizioni colturali per la maturazione in vitro degli oociti sono quelle impiegate nella gran parte dei laboratori che si occupano di biotecnologie riproduttive in vitro.

Il medium di coltura era costituito dal TCM 199 contenente il 10% di siero di pecora in estro, antibiotici, FSH e LH 10µl/ml, cisteamina 100µM e piruvato 8 mg/ml. Il sistema di maturazione era costituito da 0,5 ml di medium in una piastra four wells Nunc per colture cellulari ricoperto da paraffina liquida in cui erano coltivati per 24 ore da 25 a 40 complessi cumulo oocita a 39 °C in ambiente di massima umidità, con il 5% di CO_2 in aria atmosferica.

Dopo maturazione i complessi cumulo-oociti venivano denudati meccanicamente dalle cellule della granulosa e fertilizzati in vitro (figura 1). Il medium di fertilizzazione era composto da Sintethic Oviductal Fluid (SOF) supplementato con il 2% di siero di pecora in

estro (v/v), 50 µg/ml di streptomicina e 50 IU/ml di penicillina (Tervit et al., 1972), eparina 10 mg/ml ed ipotaurina 1 mg/ml. Per la fecondazione veniva utilizzato seme di ariete crioconservato in pellets da 250 µl. Dopo scongelamento in una provetta in vetro mediante bagnetto di acqua a 39°C, il seme veniva trasferito in un tubo conico di vetro sterilizzato contenente 1 ml di SOF e incubato per 15 minuti in condizioni standard. Gli spermatozoi mobili ottenuti mediante swim-up venivano diluiti in SOF equilibrato con una concentrazione finale di $1x10^6$ spermatozoi/ml e co-incubati in pozzetti ricoperti da olio minerale con una media di 30 oociti maturi per pozzetto in condizioni di massima umidità a 39°C, 5% di CO_2, 5% di O_2, e 90% di N_2. Dopo 24h i presunti zigoti venivano lavati e posti in coltura in four-well Petri contenente SOF + 0,4% di BSA (bovine serum albumin) supplementato con una miscela di aminoacidi essenziali e non essenziali a concentrazione oviduttale (Walker et al., 1996), ricoperti con olio minerale in condizioni atmosferiche di massima umidità con 5% di CO_2, 5% di O_2, 90% di N_2 e coltivati per 8 giorni sino al raggiungimento dello stadio di blastocisti (figura 2).

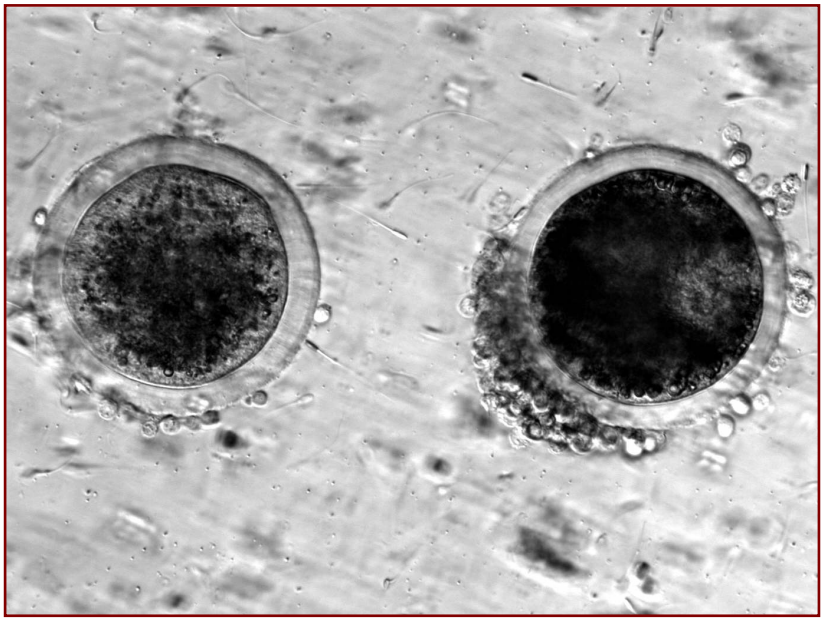


Figura 1 Oociti e spermatozoi coincubati per la fertilizzazione.

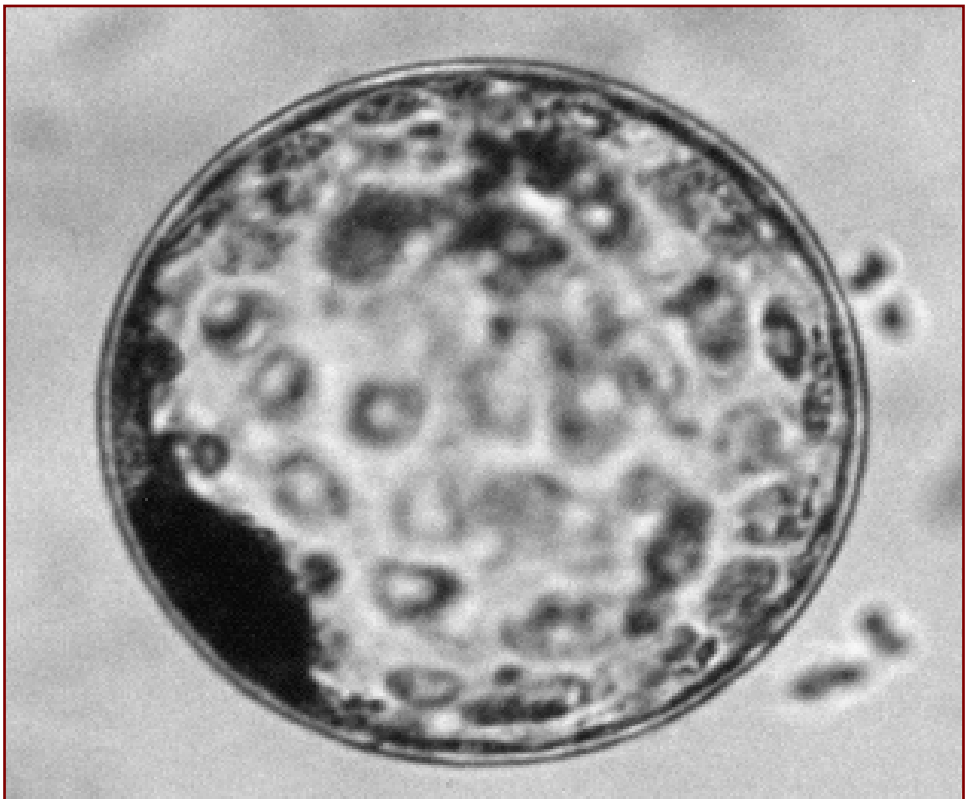


Figura 2. Stadio di blastocisti espansa.

3.2.2 Vitrificazione degli embrioni

Nelle procedure di crioconservazione è stata utilizzata una soluzione salina di base rappresentata dal PBS (Sigma) contenente siero ematico in ragione del 20% (Naitana e coll., 1997). Gli embrioni stazionavano per un periodo di 10-15 minuti nella soluzione di PBS e siero a temperatura ambiente, prima di venire trasferiti in 200 µl della soluzione di condizionamento, costituita dal medium di base contenente glicerolo (1,4 M). In questa soluzione gli embrioni stazionavano tre minuti, venivano quindi trasferiti e mantenuti per lo stesso periodo di tempo in 200 µl di una seconda soluzione di condizionamento, costituita dalla soluzione di base con glicerolo 1,4 M di e 3,6 M di glicole etilenico. Le blastocisti venivano quindi caricate in 25 µl del *medium* di vitrificazione costituito dalla soluzione di base con l'aggiunta di 3,4 M di glicerolo e 4,6 M di glicole etilenico.

Le procedure di caricamento delle *paillettes* da 0.25 ml venivano effettuate con l'ausilio di una pipetta di vetro ed avvenivano con le seguenti modalità: 60 µl di una soluzione di saccarosio 0,5 M seguiti da due bolle d'aria, 20µl della soluzione di vitrificazione contenente gli embrioni seguiti da altre due bolle d'aria e 60 µl della soluzione di saccarosio 0,5 M.

La *paillet* veniva prontamente chiusa con del polivinilpirrolidone ed immersa rapidamente in azoto liquido a -196° C per circa metà, mentre la successiva parte veniva immersa più lentamente al fine di prevenire fenomeni di frattura. Tutta l' operazione di caricamento degli embrioni nella *paillet* e la successiva immersione in azoto liquido avveniva in un tempo di circa 25-35 secondi.

Il ripristino della temperatura ambiente avveniva immergendo la *paillet* in un bagno d'acqua a 38-40°C per circa 10 secondi, fintanto che non si osservava il completo passaggio dallo stato solido a quello liquido delle soluzioni. L'intero contenuto della *paillet* veniva versato in una capsula Petri nella quale le soluzioni di saccarosio e di vitrificazione venivano miscelate e le blastocisti venivano quindi trasferite nella prima goccia contenente saccarosio 0,5 M in PBS-20% siero per tre minuti. In seguito, gli embrioni venivano lavati per 6 volte in PBSe siero con concentrazioni decrescenti di saccarosio (0, 25 M- 0,125 M e così via) in modo da permettere la loro graduale re-idratazione e poi trasferiti in una piastra con PBS e siero per almeno 5 minuti per garantire una completa reidratazione. Infine osservati al microscopio per verificare eventuali danneggiamenti macroscopici, come la rottura della zona pellucida o la lisi dei blastomeri.

Successivamente gli embrioni vengono trasferiti in 5 differenti sistemi colturali, al fine di testare le condizioni che meglio supportavano la ripresa embrionale in vitro dopo vitrificazione.

1. CTR siero: TCM-199 supplementato con il 10% di siero;
2. CTR BSA: TCM-199 supplementato con lo 0,04% di albumina serica bovina;
3. MEL 10^{-3}: TCM-199 supplementato con lo 0,04% di albumina serica bovina e melatonina 10^{-3} M;
4. MEL 10^{-6}: TCM-199 supplementato con lo 0,04% di albumina serica bovina e melatonina 10^{-6} M;
5. MEL 10^{-9}: TCM-199 supplementato con lo 0,04% di albumina serica bovina e melatonina 10^{-9} M.

Gli embrioni venivano quindi suddivisi random nei 5 differenti sistemi e posti ad incubare in ambiente di massima umidità a 39°C con il 5% di CO_2 in aria per 24-48 ore.

In seguito, tutta una serie di analisi è stata svolta per poter valutare gli effetti delle diverse concentrazioni di melatonina nel medium di coltura dopo ripristino della temperatura delle blastocisti vitrificate. In particolare, abbiamo valutato, nelle blastocisti dei 5 gruppi sperimentali: la vitalità in termini di riespansione della cavità blastocelica e schiusa delle blastocisti, il numero cellulare totale, il contenuto di ATP intracellulare, la frammentazione del DNA e lo stato ossidativo.

E' stata inoltre valutata la capacità antiossidante totale, valutata come trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), dei media di coltura utilizzati per la coltura embrionale dopo vitrificazione, sia immediatamente dopo la loro composizione sia dopo le 48 h di incubazione degli embrioni post-vitrificazione. Contemporaneamente, i valori TEAC sono stati determinati nel plasma di pecore adulte pluripare.

3.2.3 Determinazione del trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) nel plasma sanguigno e nei media di coltura

È stato effettuato un prelievo di sangue da quindici pecore adulte pluripare di razza sarda (2-4 anni), durante la stagione riproduttiva (Ottobre) con dei tubi vacutainer contenente EDTA (Vacutainer systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Il sangue veniva subito centrifugato a 1500 giri per 10 minuti, e il plasma recuperato veniva subito stoccato.
Per quanto riguarda i media di coltura con le diverse concentrazioni di melatonina, si andava a misurare la TEAC subito dopo la loro composizione e dopo 48h di coltura con gli embrioni dopo ripristino della temperatura. Le stesse analisi sono state ripetute in tre replicati.

La capacità antiossidante totale nel plasma è stata determinata usando il metodo descritto da Re e coll. (Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al.). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 1999; 26:1231-1237.)[32] con delle modifiche secondo Lewinska e altri (LEWINSKA A., M WANUK, E. SLOTA, G BARTOSZ. Total antioxidant capacity of cell culture media. Clinical and

experimental pharmacology and physiology 2007 ; 34 :781-786.).

In breve , una soluzione di ABTS· + è stata preparata sciogliendo 19,5 mg di 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS; Sigma, Deisenhofen, Germany) e 3,3 mg di potassio per solfato (Dipotassium peroxodisulphate; Sigma) in 7 ml di tampone fosfato 0,1M, pH 7,4. Questa soluzione è stata conservata al buio per 12 ore e poco prima del dosaggio diluita (approssimativamente 1:80) in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4, sino ad ottenere un'assorbanza di circa 1,0 alla lunghezza d'onda di 734 nm. Il campione è stato diluito 1:50 in tampone fosfato 0,1M pH 7,4 e l'assorbanza è stata misurata in doppio in uno spettrofotometro Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer a 734 nm, 5 minuti dopo aver aggiunto il campione alla soluzione di ABTS·+. Il decremento dell'assorbanza dell'ABTS·+ in presenza del campione è proporzionale alla capacità antiossidante del campione stesso ed è stata espressa come capacità antiossidante trolox equivalente (Trolox Equivalent Anti-Oxidant Capacity (TEAC)) e cioè concentrazione di trolox che produce lo stesso effetto antiossidante del campione studiato. Il calcolo è stato eseguito sulla base di una curva standard di soluzione di trolox 5, 10, 15 e 20 µM.

3.2.4 VITALITA' E NUMERO CELLULARE TOTALE

La riespansione della cavità blastocelica e la schiusa sono state valutate nei cinque gruppi sperimentali dalla 12h sino alla 48h di coltura. Questo esperimento è stato ripetuto in tre replicati, con un totale di 568 blastocisti utilizzate. Queste ultime sono state considerate completamente riespanse quando il loro diametro raggiungeva le dimensioni originali ossia prima della vitrificazione. Quelle schiuse venivano fissate in una soluzione di metanolo in PBS (40% v/v) e colorate con lo ioduro di propidio (10µg /mL). In seguito al lavaggio in PBS/PVA, gli embrioni venivano posti in un vetrino porta oggetto e con sopra un copri oggetto e poi osservati al microscopio a fluorescenza (Leitz Labovert, Wetzlar, Germany) per contare il numero cellulare totale (Figura 3).

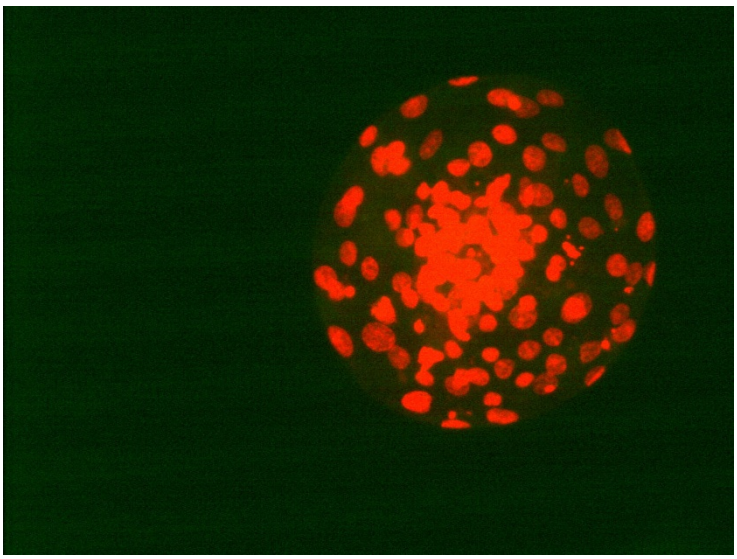


Figura 3 Blastocisti fissata in metanolo e colorata con il propidio per la conta delle cellule

3.2.5 DETERMINAZIONE DELLO STATO OSSIDATIVO

I livelli di perossidi negli embrioni venivano esaminati tramite una sonda fluoro genetica (dicloro-diidro-fluorosceina: DCHFDA) come descritto da Hascimoto et al.[35]. La quantificazione dei radicali liberi è proporzionale all'aumento della fluorescenza della sonda, che emette un verde intenso solo dopo la deacetilazione e successiva ossidazione causata principalmente dal perossido di idrogeno.

Questi esperimenti sono stati ripetuti in tre replicati con un totale di 51 blastocisti usate (CTR=9, bsa=11, MEL 10^{-9}=10, MEL 10^{-6}=10, MEL 10^{-3}=11). Dopo la vitrificazione, lo scongelamento e la coltura in vitro durante le 24 h nei 5 differenti media dapprima descritti, le blastocisti completamente riespanse venivano trasferite in un medium di coltura contenente 10mM DCHFDA. Dopo 20 minuti di incubazione, gli embrioni venivano posti a coincubare con HOECHST 33342 (10µg/ml) per 10 minuti, poi lavati in TCM199 con l'aggiunta di 25Mm di HEPES e 0,1% (w/v) di PVA. Gli embrioni venivano poi montati su vetrino e la fluorescenza emessa veniva analizzata tramite microscopio a fluorescenza (Leitz Labovert) con l' uso del filtro FITC (eccitazione 405-435 nm; emissione 515nm). In maniera da ridurre gli errori delle osservazioni soggettive, i vetrini sono stati osservati da tre diversi

operatori. Le cellule risultate positive alla DCHFDA si presentavano con una fluorescenza verde, mentre l'HOECHST colorando i nuclei di blu, indicava il numero cellulare totale per blastocisti.

3.2.6 ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA (TUNEL TEST)

L'analisi della frammentazione del DNA è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit commerciale (ClicK-iT Tunel Alexa Fluor Imaging Assay, Invitrogen).

Il test si basa su una reazione chimica tra una molecola fluorescente (Alexa Fluor* Azide) e un nucleotide modificato (EdUTP), inserito enzimaticamente dalla TDT (terminal deoxynucleotidyl transferase) nel DNA frammentato.

Nella figura 4 sono schematizzati i vari passaggi del test.

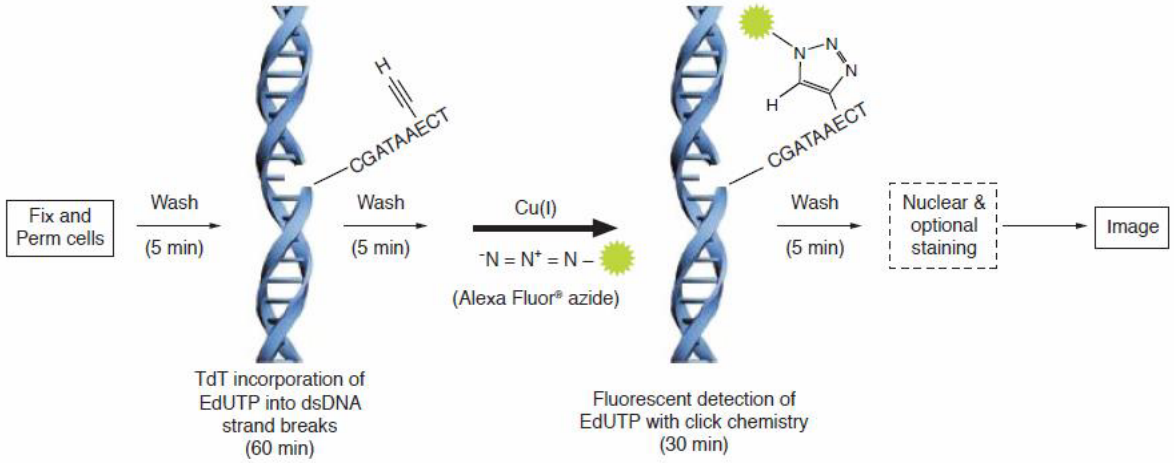


Figura 4 Test di analisi della frammentazione del DNA

Questo esperimento è stato ripetuto in tre replicati e sono stati utilizzati un totale di 53 embrioni (CTR n=10; BSA n=11; Mel 10^{-9} n=11; Mel 10^{-6} n= 10; Mel 10^{-3} n= 11). Dopo vitrificazione, ripristino della temperatura e cultura in vitro per 24 h nei 5 differenti media, le blastocisti che presentavano una completa riespansione della cavità blastocelica venivano lavate per quattro volte in PBS supplementato con 1mg/ml di polyvinyl-pyrrolidone

(PBS/PVP) prima di venire fissati per 1 h in paraformaldehyde al 4% in PBS a temperatura ambiente.

Trascorso questo tempo di fissazione, gli embrioni venivano lavati in PBS-PVA e in seguito permeabilizzati in Triton X-100 0.5% in PBS per 1 h a temperatura ambiente e infine nuovamente lavati in PBS/PVA.

Sono stati utilizzati 4 embrioni in cui si provocava la frammentazione del Dna con l'enzima DNase I. Gli embrioni venivano lavati con PBS-PVA e successivamente venivano incubati con la soluzione contenente la DNase. La reazione avveniva a temperatura ambiente in 30 minuti.

Il gruppo di embrioni del controllo positivo e il gruppo di embrioni trattati venivano sottoposti a reazione enzimatica della deossinucleotidil terminal transferasi, che lega alle estremità 3'OH libere del DNA frammentato, un piccolo polinucleotide, contenente il nucleotide modificato: EdUTP.

Ad ogni gruppo sperimentale si aggiungevano, per 10 minuti, 100µl totali di buffer di reazione presente nel Kit. In seguito gli embrioni venivano trasferiti nel buffer contenente 60 Unità di TDT e il polinucleotide con l'EdUTP, per 60 minuti a 37°C. Infine veniva rimosso il cocktail di reazione mediante 2 lavaggi da 2 minuti ciascuno con PBS/PVA.

Al frammento polinucleotidico inserito nel DNA frammentato degli embrioni e contenente il nucleotide EdUTP, si aggiungeva la molecola fluorescente Alexa Fluor* azide.

L'incubazione degli embrioni con la molecola fluorescente (Alexa Fluor* azide) per 30 minuti, consente la reazione chimica di tale molecola con il gruppo alcalino dell'EdUTP. La reazione deve avvenire al buio e a temperatura ambiente. L'Alexa Fluor* azide, ha una lunghezza d'onda di eccitazione/emissione pari a 490/520: eccitato a 490 nm, emette una luce verde.

I nuclei totali delle cellule venivano colorati con Hoecst 33342 (3 µg/ml), con una lunghezza d'onda di eccitazione/emissione pari a 350/461. Gli embrioni venivano infine lavati in PBS/PVA, caricati su vetrino e e visualizzati sia al Microscopio a Fluorescenza (Olympus) equipaggiato con una fotocamera CCD e supportato con un software di immagine Olympus CellF, sia al Microscopio Confocale Leica TCS SP5 (figura 5).

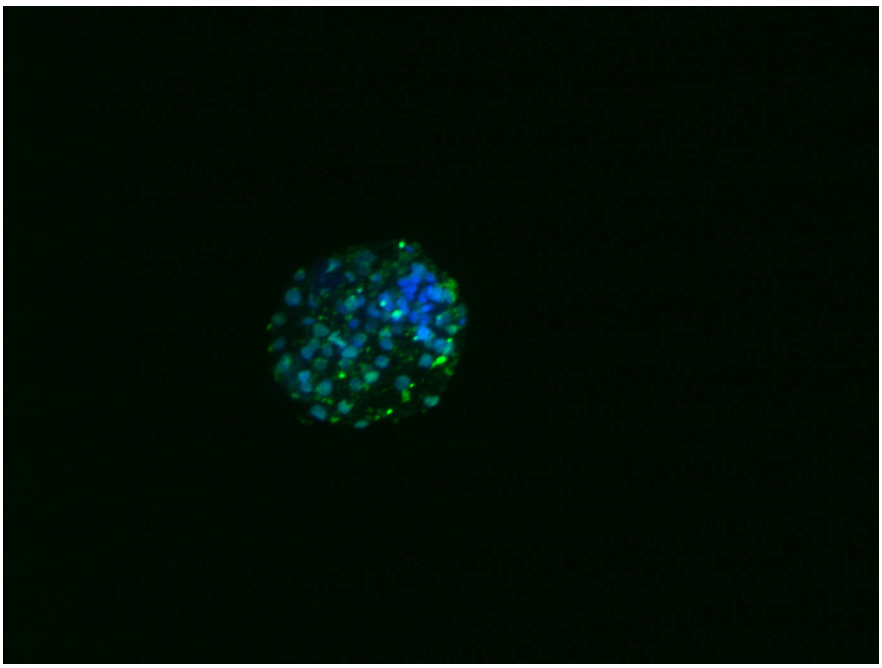


Figura 5 Blastocisti colorata in Hoects 33342(fluorescenza blu) che rappresentano i nuclei totali mentre quelli in verde sono i nuclei positivi al TUNEL TEST colorati con Alexa Fluor*azide

3.2.7 ESTRAZIONE E MISURAZIONE DELL'ATP INTRACELLULARE

Per questo esperimento sono stati utilizzati 222 embrioni ed è stato ripetuto tre volte (CTR n= 39; BSA n=43; MEL 10^{-3} n = 44; MEL 10^{-6} n= 48; MEL 10^{-9} n=48). Dopo la vitrificazione, lo scongelamento e la coltura in vitro per 24h nei 5 diversi media, le blastocisti completamente riespanse di ciascun gruppo venivano lavate per due volte con PBS/PVA. Per l' estrazione dei nucleotidi venivano aggiunti, nelle eppendorf contenenti gli embrioni, 0,01ml di acido perclorico freddo (0,6 mol/L) e lasciati in ghiaccio per un quarto d' ora. La sospensione veniva in seguito centrifugata in una Eppendorf Microfuge (3 minuti a 1000 rpm) e il surnatante neutralizzato con 1,5 µl di 3,5mol/L di K_2CO_3 [Balestri et al.]. Dopo un'ulteriore centrifugata (3 minuti a 10000 rpm) il surnatante veniva analizzato con l' elettroforesi capillare, come in precedenza validato (Zinellu et al. 2010). Per la

derivatizzazione dei campioni, a 10µl di campione o di standard venivano aggiunti 40µl di ethyl-3-(3=N,N= dymethyl-amynopropyl)-carbodiimide (1,8mol/l) (disciolta in 50 mmol/l Hepes buffer, pH6.5) e 5 µl di Bodipy FLEDA (27 mmol/l) (sciolto in 50 mmol/ Hepes buffer, pH 6.5) e posti ad incubare per 25 h a 37° C al buio. Prima di effettuare l'analisi i campioni derivatizzati venivano diluiti per 40 volte in acqua. Si è utilizzato il P/ACE 5510 CE, un sistema munito con Laser Induced Fluorescence (Beckam instruments, CA, USA).

Le analisi sono state svolte mettendo 21µl di campione sotto pressione dell'azoto (0.5psi) per 3 secondi alla concentrazione di 10 mmol/L di sodio fosfato buffer con pH 11.4.

3.2.8 ANALISI STATISTICA

Tutti i dati sono stati espressi come media ± S.E.M. I valori sono stati analizzati mediante ANOVA, utilizzando un software statistico (Statgraphic Centurion XV- version 15.2.06 per Windows; StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA). Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $P \leq 0.05$

3.3 RISULTATI

3.3.1 Determinazione del trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) nei media di coltura

I valori del TEAC differiscono significativamente tra gli embrioni nei 5 media di coltura. Come ci si aspettava, il medium con la più alta concentrazione di melatonina presenta un alto valore di TEAC, e raggiunge dei valori paragonabili a quelli trovati nei campioni di plasma di pecora adulta (8.7±2.4 mM). Gli altri media presentano dei valori bassi di TEAC ($p< 0,01$), inferiori rispetto al range del plasma sanguigno (grafico 1). È interessante notare che questi valori cambiano in maniera significativa nell'arco delle 48 ore di incubazione con le blastocisti scongelate. In particolare, si osserva una marcata diminuzione solo nel medium con la più alta concentrazione di melatonina. Per quanto riguarda le altre concentrazioni non si osserva un cambiamento significativo dei valori iniziali. Quindi , alla fine del periodo di incubazione, il gruppo MEL^{-3} mantiene valori TEAC elevati, seguita da MEL^{-9}, BSA, CTR e MEL^{-6} ($p<0.0001$).

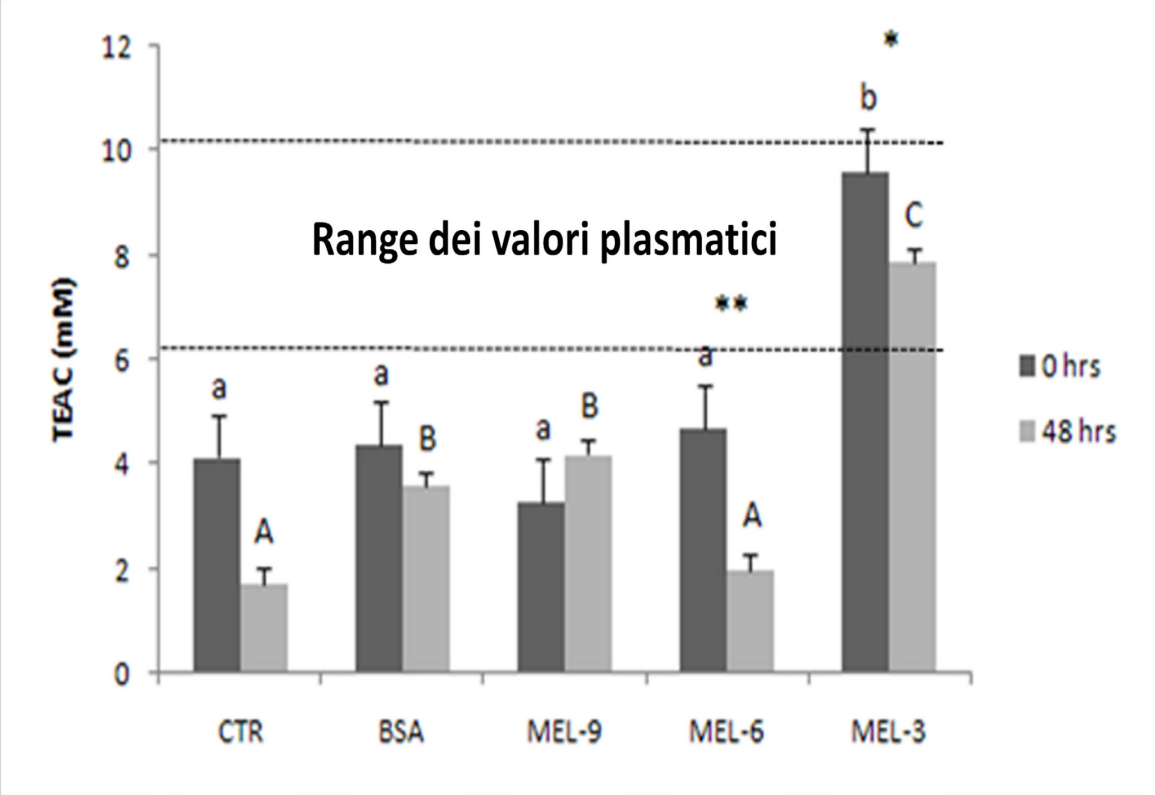


Grafico 1 TEAC nei cinque media di coltura embrionale prima (o ore) e dopo 48 h di incubazione con embrioni vitrificati. Le due linee di demarcazione indicano il range dei valori (8.7 ± 2.4 mM) TEAC riscontrati in 15 pecore adulte durante la stagione riproduttiva.

Le lettere minuscole indicano differenze statisticamente significative a 0 ore a ≠ b p≤0,01 (ANOVA)

Le lettere maiuscole indicano differenze statisticamente significative dopo 48 ore di coltura A ≠ B ≠ C p<0.0001.

** Indicano differenze statisticamente significative tra 0 e 48 ore nei gruppi: ANOVA p<0.05
* Indicano la tendenza verso delle differenze statisticamente significative tra 0 e 48 ore tra alcuni gruppi : ANOVA p=0,0597

3.3.2 VITALITA' E NUMERO CELLULARE TOTALE

La composizione dei media usati dopo ripristino della temperatura e la coltura in vitro delle blastocisti determina una differenza statisticamente significativa sia nelle percentuali di riespansione che di schiusa delle blastocisti. In particolare, sono state osservate elevate percentuali di riespansione nel medium con la concentrazione più bassa di melatonina, che non differiscono rispetto a quelli ottenuti nel gruppo controllo (tabella 1; $p < 0,01$). Inoltre anche le percentuali di schiusa sono più alte nel gruppo MEL^{-9} rispetto agli altri ($p<0.05$). Questi risultati confermano precedenti studi in cui si evidenziava come il tempo di riespansione della cavità blastocelica dopo la vitrificazione, il ripristino della temperatura e la coltura in vitro risultava associata alla capacità dell'embrione di resistere alle ingiurie della vitrificazione e pertanto può essere considerato un marker attendibile di competenza allo sviluppo degli embrioni vitrificati (Leoni et al.,2007). Allo stesso modo , il numero cellulare totale, un marker comunemente usato per valutare la qualità dell'embrione (Iwasaki et al., 1994; Kaidi et al.,1998) risulta essere maggiore nel gruppo CTR e MEL^{-9} comparato agli altri gruppi ($p< 0.05$).

		Riespanse(%)				
	Embrioni congelati	24 h	48 h	Totale	Schiusa	Numero totale di cellule
		27	6	33	14	
CTR	100	(27 ± 3.8)^{a,b}	(6 ± 3.6)	(18.7 ± 5.5)	(14 ± 5.2)^{a}	199.1 ± 21.8^{a}
		19	9	28	11	
BSA	123	(12.3 ± 4.4)^{c}	(6.4 ± 4.1)	(33 ± 4.8)	(11.7 ± 6)^{a}	154 ± 15.8^{a,b}
		32	5	37	27	
MEL^{-9}	99	(36.6 ± 4.4)^{a}	(4.2 ± 4.1)	(40.7 ± 5.5)	(33.9 ± 6)^{a}	189 ± 17.1^{a}
		15	11	26	17	
MEL^{-6}	123	(12.9 ± 3.8)^{c}	(8.7 ± 3.6)	(21.6 ± 4.8)	(13.3 ± 5.2)^{a}	127 ± 18.7^{b}
		26	8	34	15	
MEL^{-3}	123	(18.5 ± 4.4)^{a,c}	(8.4 ± 4.1)	(26.8 ± 5.5)	(5.1 ± 6)^{a}	146.5 ± 15.8^{a,b}
		p<0.01			p<0.05	p<0.05

Tabella 1. Percentuali di riespansione nei diversi gruppi sperimentali

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative: ANOVA $p \leq 0,05$

3.3.3 DETERMINAZIONE DELLO STATO OSSIDATIVO

L'indice ossidativo delle blastocisti è stato calcolato dividendo il numero delle cellule positive alla sonda DCHFDA sul numero totale delle cellule per embrione. Le blastocisti messe in coltura con siero e melatonina 10^{-9} M hanno un basso indice ossidativo rispetto a quello evidenziato negli altri gruppi (grafico 2; $p< 0.0001$).

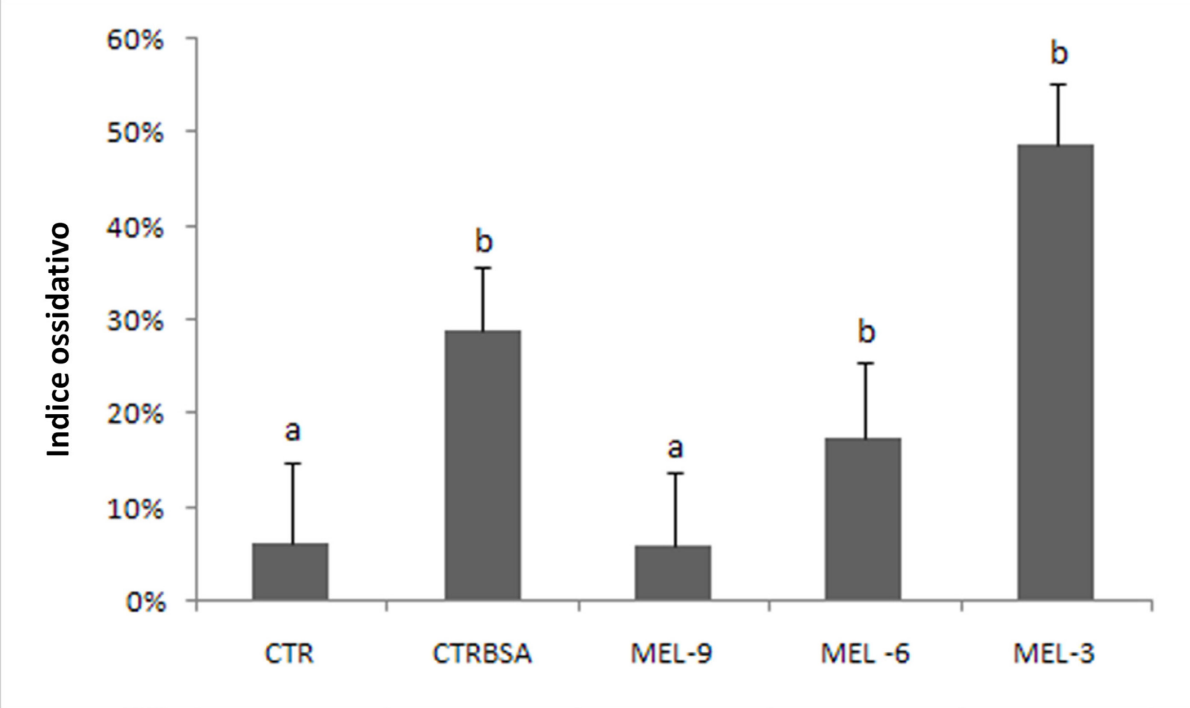


Grafico 2 Indice ossidativo delle blastocisti.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative $p< 0.0001$

3.3.4 ANALISI DELLA FRAMMENTAZIONE DEL DNA (TUNEL TEST)

I nuclei colorati di verde nel controllo positivo, che indicano il successo della reazione

di questo test, mentre i nuclei colorati di rosso risultano negativi alla stessa, andando a indicare l'assenza di fluorescenza.

L'apoptosi nelle blastocisti è stata determinata dopo vitrificazione, ripristino della temperatura e coltura in vitro per 24 h nei differenti media di coltura considerati. La coltura in presenza di siero o di concentrazioni di melatonina più basse (MEL-6 e MEL-9) ha esercitato un effetto protettivo anti-apoptotico sulle cellule embrionali, come indicato da un significativo minore numero di cellule positive al test ($p<0.01$; grafico 3) rispetto agli altri embrioni messi in coltura con BSA o con la più alta concentrazione di melatonina (MEL^{-3}).

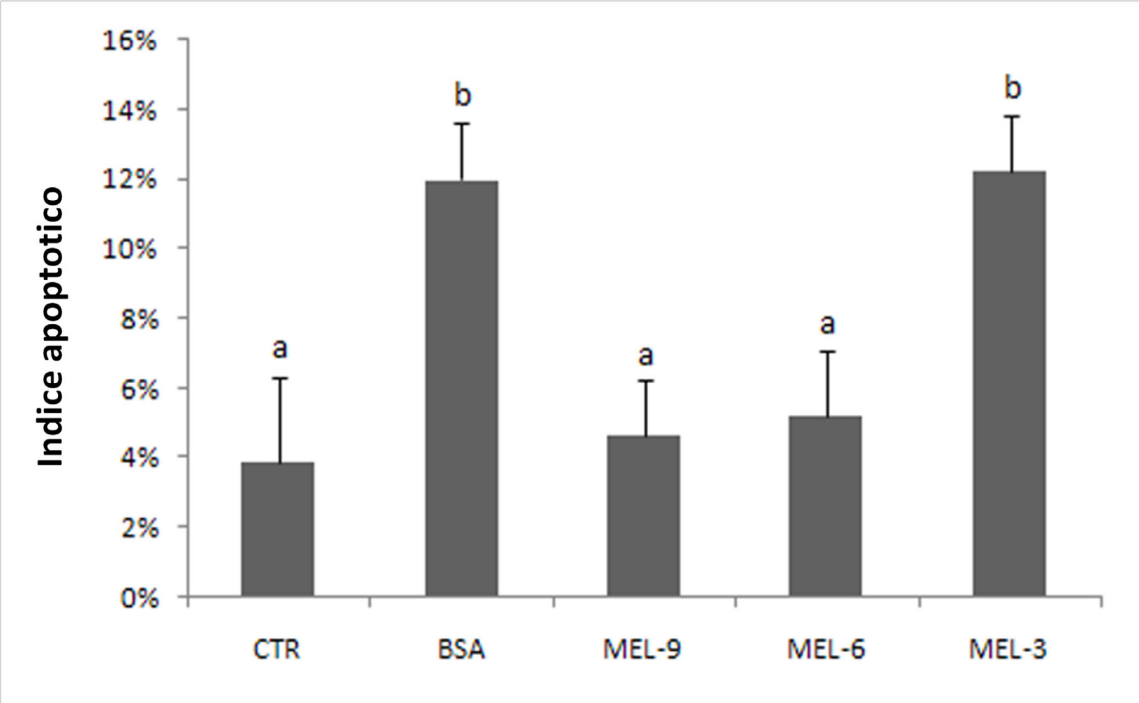


Grafico 3 Indice apoptotico delle blastocisti.

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative $p<0.01$

3.3.5 MISURAZIONE DELL'ATP INTRACELLULARE

I media di coltura a cui sono stati esposti gli embrioni dopo la vitrificazione e il ripristino della temeperatuta hanno dimostrato influenzare il loro stato energetico. La più bassa concentrazione di ATP per blastocisti è stata riscontrata nel gruppo MEL^{-3}, mentre non si sono osservate differenze negli altri gruppi sperimentali ($p< 0.05$,grafico 4).

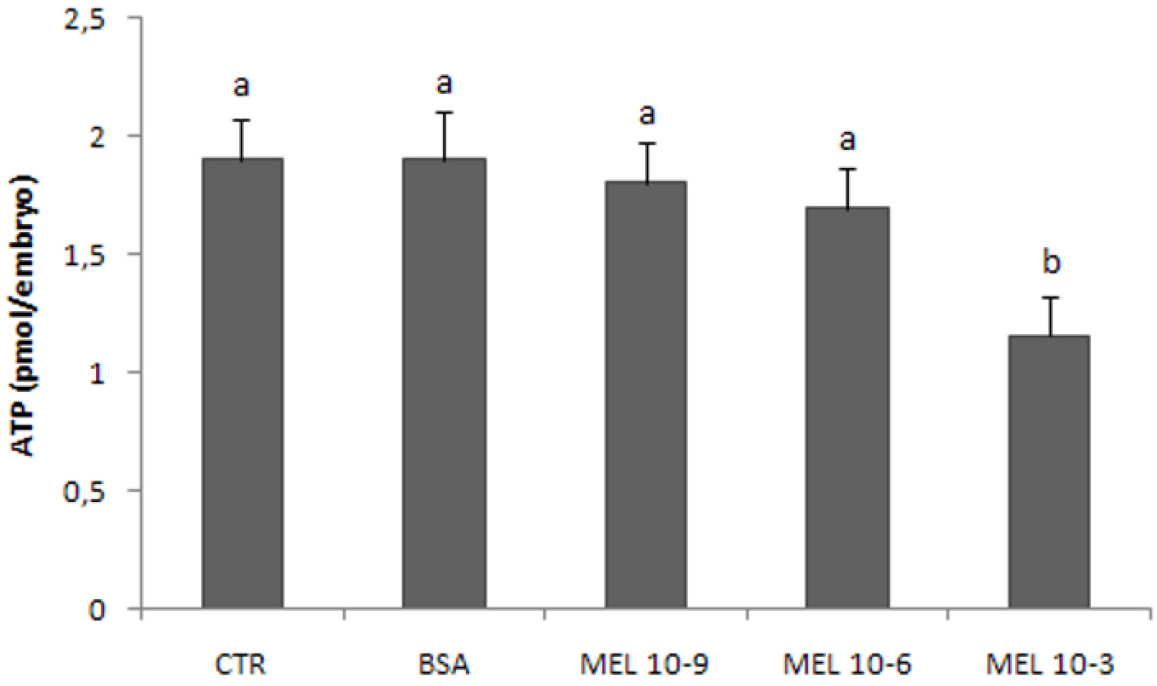


Grafico 4 Concentrazione ATP intracellulare

Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative $p< 0.05$

3.4 DISCUSSIONE

La manipolazione dei gameti e degli embrioni in vitro sottopone gli stessi al rischio che possano essere esposti ad alti livelli di ROS. Gli embrioni producono ROS mediante diverse vie, vale a dire fosforilazione ossidativa, nicotinammide adenina di nucleotide, fosfato ossidasi, e sistema xantina-ossidasi [4]. È noto a tutti che la produzione di ROS risulta maggiore negli embrioni prodotti in vitro piuttosto che in quelli prodotti in vivo [36]. Come risulta, lo stress ossidativo risulta implicato nella compromissione dello sviluppo in vitro degli embrioni di mammifero [34,37]. Durante la crioconservazione l' embrione diventa molto sensibile agli stress ossidativi, con una risultante perossidazione dei lipidi, lesioni alla membrana e distruzione della struttura [38,40]. Per questo motivo, la detossificazione dei ROS durante il periodo critico dello scongelamento dell'embrione in coltura potrebbe garantire un alto tasso di gravidanza. Alcuni studi suggeriscono che gli embrioni crioconservati dovrebbero essere messi in coltura per almeno 3-16 ore in modo da facilitare il recupero degli stessi prima del trasferimento [40,41].

Nel presente studio, l'aggiunta di melatonina nei media di coltura, presenta un effetto dose – dipendente nella vitalità e nello stato metabolico delle blastocisti . L'aggiunta di questa indolamina, come potente antiossidante, accresce significativamente la capacità antiossidante totale del medium di coltura quando quest' ultima è presenta nella più alta concentrazione ($MEL^{-3)}$, raggiungendo così i valori paragonabili a quelli riscontrati nel plasma sanguigno delle pecore. Questo incremento nella capacità antiossidante del medium tuttavia, risulta associata ad un deleterio effetto sulla vitalità e stato metabolico, come posto in evidenza da una bassa riespansione e schiusa, basso numero totale di cellule,bassa concentrazione intracellulare di ATP, alto indice apoptotico e ossidativo degli embrioni rispetto agli altri media. Questo effetto dannoso causato dall' alta concentrazione di melatonina (mel^{-3}) durante la coltura in vitro degli embrioni è stata già in pecedenza descritta [23,31]. Questi risultati suggeriscono che la melatonina ad altra concentrazione potrebbe esercitare un effetto tossico nella fase di pre- impianto degli embrioni.

D'altra parte una bassa concentrazione (10^{-9}) di melatonina ha un effetto positivo per lo sviluppo degli embrioni in vitro dopo la vitrificazione e lo scongelamento come viene

dimostrato da un' elevata riespansione, schiusa e numero cellulare totale. I risultati ottenuti risultano comparabili a quelli degli embrioni messi in coltura con l'FCS. Infatti il siero ha effetto stimolante per lo sviluppo delle blastocisti [42,43]. Inoltre svolge un effetto protettivo nella crioconservazione [44,45]. La melatonina va a svolgere azione di promozione nello sviluppo in vitro degli embrioni. Quando aggiunta nel medium di coltura, sia a fresco [24] che negli embrioni a due cellule di topo vitrificati/scongelati [23], lo sviluppo di blastocisti così come la schiusa e il numero cellulare subiscono un aumento (nel range 10^{-11}-10^{-5} M). In particolare gli effetti benefici della melatonina (10^{-9} M) nello sviluppo embrionale in vitro dopo la vitrificazione e lo scongelamento risulta parzialmente attribuito alla sua capacità antiossidante, come evidenziato da elevati livelli intracellulari di glutatione (GSH) e riduzione di ROS [23]. La sostanziale riduzione di ROS negli embrioni trattati con melatonina si è anche osservato nel suino [30,46]. In un recente studio, la melatonina (10^{-7} M) regola in maniera positiva l'espressione del gene superossido dismutasi nello sviluppo in vitro di embrioni di topo [21]. Così tutto questo ci suggerisce che la melatonina svolge attività di potente scavenger contro i radicali liberi e una capacità antiossidante con benefici effetti nello sviluppo embrionale. Il presente studio supporta questi risultati. La melatonina (10^{-9} M) riduce l'indice ossidativo durante la coltura embrionale dopo ripristino della temperatura, e a questo riguardo risulta avere un'efficacia comparabile a quella dell'FCS. Ad alte concentrazioni, tuttavia, sembra eserciti un'azione pro ossidattiva come evidenziato dall'aumento della fluorescenza sensibile all'ossidazione. Questo effetto viene indirettamente evidenziato da una marcata decrescita della capacità antiossidante totale nei media cui è stata aggiunta la melatonina a più alta concentrazione dopo 48 h di incubazione con gli embrioni. Negli altri media la TEAC non presenta dei cambiamenti significativi dai valori iniziali. È stato riportato che l'incubazione di un embrione porta ad una significativa riduzione della capacità antiossidante totale del medium[47]. È interessante che la misura di questo decremento sia correlabile alla qualità dell'embrione, con il maggiore declino osservato blastocisti negli embrioni di bassa qualità. Gli autori hanno ipotizzato che la diminuzione della TAEC nei media sia dovuta alla neutralizzazione degli antiossidanti esogeni causata dai ROS prodotti dall' embrione[47].

Recenti scoperte indicano che la melatonina ad alte concentrazioni (1-0.1 mM) è in grado di produrre ROS nella linea di cellule tumorali [48,50]. Molti ben noti antiossidanti come il tocoferolo o l'acido ascorbico possono esercitare un' attività pro-ossidante [51,52].

Nel caso della melatonina, questa sua attività pro-ossidantea concentrazioni millimolari viene associata all' effetto pro apoptotico mediato da un aumento dell' attività di caspase-9 e –3 [48,53,54] . Il presente studio pertanto va a documentare la crescita dell' indice apoptotico nelle blastocisti quando nei media di coltura post-votrificazione viene aggiunta una elevata concentrazione di melatonina (10^{-3} M).

D'altra parte, basse concentrazioni (10^{-9}e 10^{-6} M) mostravano un effetto anti-apoptotico rispetto al medium contenente solo BSA. Il basso indice apoptotico riscontrato con l'aggiunta di melatonina nei media è legato all' abilità della stessa di down regolare l'espressione del gene pro apoptotico p53, BAX, e CASPASE-3 mentre up- regola l'espressione del gene anti apoptotico bcl-2, come descritto durante lo sviluppo del pronucleo embrionale di topo [21]. Lo studio di Vandaele e Van Soom [44] afferma che la melatonina (10^{-7} M) riduce in maniera significativa l'apoptosi negli embrioni di topo coltivati in vitro. Negli embrioni a due cellule di topo vitrificati l'aggiunta di melatonina alla concentrazione di 10^{-11} e 10^{-5}M riduce l'indice apoptotico [23]. La morte cellulare per apoptosi è un altro importante fattore che compromette lo sviluppo della coltura embrionale in vitro [44].

Nel presente studio è stato anche investigato l'effetto della melatonina sullo stato energetico degli embrioni scongelamento dopo la vitrificazione. È stato evidenziato che la melatonina esercita un'azione protettiva nei confronti dei mitocondri[19]. Accresce inoltre l'attività del complesso I e IV della catena del trasporto degli elettroni, aumentando così la respirazione mitocondriale la sintesi di ATP sia in condizioni di normali che di stress [55]. Abbiamo in precedenza riportato che l'aggiunta di melatonina (1Mm) nel mestruo di congelamento del seme di ariete protegge gli spermatozoi dai danni congelamento provocati dalle basse temeperature e va ad aumentare la concentrazione dell' ATP intracellulare dopo il congelamento [56]. Tuttavia, dai risultati ottenuti si è potuto osservare che l'aggiunta di melatonina (10^{-6} e 10^{-9}) nella coltura scongelamento dopo ripristino della temperatura non ha sortito alcun effetto sui livelli di ATP intracellulare nelle blastocisti IVP. Una significativa diminuzione dell' ATP è stata vista solo con la somministrazione di alte concentrazione di melatonina (10^{-3} M) ed è probabilmente legato all'effetto proossidativo già in precedenza descritto che la melatonina esercita quando utilizzata a queste dosi.

Per concludere, questo studio evidenzia che una bassa concentrazione di melatonina (10^{-9}M) risulta benefica per ristabilire tutte le funzioni dell'embrione dopo la vitrificazione e

il ripristino della temperatura, come evidenziato da maggiori percentuali di riespansione e schiusa degli embrioni, da un maggiore numero di cellule totali, un minore indice ossidativo ed apoptotico rispetto agli altri media testati. Infatti i risultati ottenuti in termini di vitalità embrionale e stato metabolico sono comparabili a quelli ottenuti con il medium addizionato con FCS. Tuttavia, per la natura indefinita e variabilità nella composizione del siero, e una maggiore probabilità di rischio di infezione dai fluidi biologici inquinati, lo sviluppo di un medium definito e di supportare la ripresa delle blastocisti dopo la vitrificazione e ripristino della temperatura sarebbe altamente auspicabile. I benefici effetti riportati dall'utilizzo della melatonina a basse concentrazioni (10^{-9}M) durante questo periodo critico per l'embrioni possono certamente essere presi in considerazione per la composizione costituzione di media di coltura embrionale. Alte concentrazioni di melatonina, al contrario, sembrano esercitare un effetto tossico nello sviluppo degli embrioni durante le fasi successive alla vitrificazione e ripristino della temperatura, dovuto all'effetto pro ossidativo accompagnato da un aumento dell' indice apoptotico e da una diminuzione della concentrazione intracellulare di ATP. Quindi la dose di melatonina impiegata è elemento chiave per ottenere gli effetti desiderati.

BIBLIOGRAFIA

1. Edgar DH, Bourne H, Speirs AL et al. A quantitative analysis of the impact of cryopreservation on the implantation potential of human early cleavage stage embryos. Human Reproduction 2000; 15:175-179.

2. Dattena M, Accardo C, Pilichi S et al. Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. Theriogenology 2004; 62:481-493.

3. Leibo SP, Loskutoff NM Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. Theriogenology 1993; 39:81-94.

4. Guerin P, EL Mouatassim S, Menezo Y Oxidative stress and 423 protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human Reproduction Update 2001; 7:175-189.

5. Gardiner CS, Salmen JJ, Brandt CJ et al. Glutathione is present in reproductive tract secretions and improves development of mouse embryos after chemically induced glutathione depletion. Biology of Reproduction 1998; 59:431-436.

6. Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. Fertility and Sterility 2006; 86:503-512.

7. Ahn HJ, Sohn IP, Kwon HC et al. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. Mol Reprod Dev 2002; 61:466-76.

8. Tatone C, DI Emidio G, Vento M et al. Cryopreservation and oxidative Stress in reproductive cells. Gynecol Endocrinol 2010; 26:563-7.

9. Somfai T, Ozawa M, Noguchi J et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine Oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. Cryobiology 2007; 55:115-126.

10. Donnay I, Auquier P, Kaidi S et al. Vitrification of in vitro produced bovine blastocysts: methodological studies and developmental capacity. Animal Reproduction Science 1998; 52:93-104.

11. Lane M, Maybach JM, Gardner DK Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. Human Reproduction 2002; 17:2686-2693.

12. Finkel T, Holbrook NJ Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 2000; 408:239-47.

13. Tan DX, Manchester LC, Terron MP et al. One molecule, many derivatives: A never-

ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? Journal of Pineal Research 2007; 42:28-42.

14. Okatani Y, Wakatsuki A, Kaneda C Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain. Journal of Pineal Research 2000; 28:89-96.

15. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. Journal of Pineal Research 2004; 36:1-9.

16. Fischer TW, Kleszczyński K, Hardkop LH et al. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. Journal of Pineal Research 2013; 54:303-312.

17. Tajes Orduna M, Pelegri Gabalda C, Vilaplana Hortensi J et al. An evaluation of the neuroprotective effects of melatonin in an in vitro experimental model of age-induced neuronal apoptosis. Journal of Pineal Research 2009; 46:262-267.

18. Yamamoto HA, Mohanan PV Melatonin attenuates brain mitochondria DNA damage induced by potassium cyanide in vivo and in vitro. Toxicology 2002; 179:29-36.

19. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G et al. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. Journal of Pineal Research 2005; 38:1-9.

20. Jou MJ, Peng TI, Yu PZ et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. Journal of Pineal Research 2007; 43:389-403.

21. Wang F, Tian X, Zhang L et al. Melatonin promotes the in vitro development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine.

Journal of Pineal Research 2013.

22. Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M et al. The effect of melatonin on thedevelopmental potential and implantation rate of mouse embryos. Cell Journal 2012; 14:203- 208.

23. Gao C, Han HB, Tian XZ et al. Melatonin promotes embryonic development And reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. Journal of Pineal Research 2012; 52:305-311.

24. Tian XZ, Wen Q, Shi JM et al. Effects of melatonin on in vitro development of mouse two cell embryos cultured in HTF medium. Endocrine Research 2010; 35:17-23.

25. Abecia JA, Forcada F, Zuniga O The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. Veterinary Research Communications 2002; 26:151-158.

26. Berlinguer F, Leoni GG, Succu S et al. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model.Journal of Pineal Research 2009; 46:383-391.

27. Cebrian-Serrano A, Salvador I, Raga E et al. Beneficial Effect of Melatonin on Blastocyst In Vitro Production from Heat-Stressed Bovine Oocytes. Reproduction in Domestic Animals 2013.

28. Takada L, Junior AM, Mingoti GZ et al. Effect of melatonin on DNA damage of bovine cumulus cells during in vitro maturation (IVM) and on in vitro embryo development. Research in Veterinary Science 2012; 92:124-127.

29. Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E et al. Melatonin effect on bovine embryo development in vitro in relation to oxygen concentration. Journal of Pineal Research 2007; 43:321-326.

30. Shi JM, Tian XZ, Zhou GB et al. Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. Journal of Pineal Research 2009; 47:318-323.

31. Rodriguez-Osorio N, Kim IJ, Wang H et al. Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos in vitro. Journal of Pineal Research 2007; 43:283-288.

32. Leoni G, Berlinguer F, Rosati I et al. Resumption of metabolic activity of vitrified/warmed ovine embryos. Molecular Reproduction and Development 2003; 64:207- 213.

33. Naitana S, Ledda S, Loi P et al. Polyvinyl alcohol as a defined substitute for serum in vitrification and warming solutions to cryopreserve ovine embryos at different stages of development. Animal Reproduction Science 1997; 48:247-256.

34. Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al. Antioxidant activity applying 506 an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 1999; 26:1231- 237.

35. Lewinska A, Wnuk M, Slota E et al. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 2007; 34:781-786.

36. Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed in vitro or in vivo. Development 1990; 109:501-507.

37. Hashimoto S, Minami N, Yamada M et al. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: Relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. Molecular Reproduction and Development 2000; 56:520-526.

38. Balestri F, Giannecchini M, Sgarrella F et al. Purine and pyrimidine nucleosides preserve

human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. Neurochemistry International 2007; 50:517-523.

39. Zinellu A, Pasciu V, Sotgia S et al. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for ATP quantification in spermatozoa and oocytes. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2010; 398:2109-2116.

40. Leoni GG, Berlinguer F, Succu S et al. A new selection criterion to assess good quality ovine blastocysts after vitrification and to predict their transfer into recipients. Molecular Reproduction and Development 2008; 75:373-382.

41. Kaidi S, Donnay I, Van Langendonckt A et al. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. Animal Reproduction Science 1998; 52:39-50.

42. Goto Y, Noda Y, Mori T et al. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. Free Radical Biology and Medicine 1993; 15:69-75.

43. Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A et al. Effects of oxygen 532 concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. Theriogenology 2004; 62:1186-1197.

44. Martinez AG, Valcarcel A, De Las Heras MA et al. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: in vitro and in vivo evaluations. Animal Reproduction Science 2002; 73:11-21.

45. Feugang J-M, DE Roover R, Moens A et al. Addition of β-mercaptoethanol or TroloxR at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. Theriogenology 2004; 61:71-90.

46. Nedambale TL, Du F, Yang X et al. Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro

produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β-mercaptoethanol. Animal Reproduction Science 2006; 93:61-75.

47. Kasai M, Ito K, Edashige K Morphological appearance of the cryopreserved mouse blastocyst as a tool to identify the type of cryoinjury. Human Reproduction 2002; 17:1863- 1874.

48. Pinyopummintr T, Bavister BD Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. Theriogenology 1994; 41:1241-1249.

49. Lim KT, Jang G, Ko KH et al. Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. Theriogenology 2007; 67:293-302.

50. Leoni G, Bogliolo L, Berlinguer F et al. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: Effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. Cryobiology 2002; 45:204-212.

51. Succu S, Berlinguer F, Leoni GG et al. Calcium concentration in vitrification medium affects the developmental competence of in vitro matured ovine oocytes. Theriogenology 2011; 75:715-721.

52. Kang J-T, Koo O-J, Kwon D-K et al. Effects of melatonin on in vitro 560 maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. Journal of Pineal Research 2009; 46:22-28.

53. Paszkowski T, Clarke RN Antioxidative capacity of preimplantation embryo culture medium declines following the incubation of poor quality embryos. Human

Reproduction 1996; 11:2493-2495.

54. Bejarano I, Espino J, Barriga C et al. Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: Relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 2011; 108:14-20.

55. Osseni RA, Rat P, Bogdan A et al. Evidence of prooxidant and antioxidant action of melatonin on human liver cell line HepG2. Life Sciences 2000; 68:387-399.

56. Buyukavci M, Ozdemir O, Buck S et al. Melatonin cytotoxicity in human leukemia cells: relation with its pro-oxidant effect. Fundamental & Clinical Pharmacology 2006; 20:73-79.

57. Otero P, Viana M, Herrera E et al. Antioxidant and prooxidant effects of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and flavonoids on LDL submitted to different degrees of oxidation. Free Radical Research 1997; 27:619-626.

58. Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE et al. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. Nature 1998; 392:559.

59. Bejarano I, Espino J, Marchena A et al. Melatonin enhances hydrogen peroxide induced apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. Molecular and Cellular Biochemistry 2011; 353:167-176.

60. Rubio S, Estevez F, Cabrera J et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by melatonin in human myeloid HL-60 cells. Journal of Pineal Research 2007; 42:131-138.

61. Acuna-Castroviejo D, Escames G, Rodriguez MI et al. Melatonin role in the mitochondrial function. Frontiers in Bioscience 2007; 12:947-963.

62. Succu S, Berlinguer F, Pasciu V et al. Melatonin protects ram 587 spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. Journal of Pineal Research 2011; 50:310-318.

4. 2° ESPERIMENTO: EFFETTO DELLE MELATONINA SULL'ATTIVITÀ OVARICA IN PECORE PINEALECTOMIZZATE

4.1 INTRODUZIONE

Le specie stagionalizzate hanno sviluppato dei meccanismi di limitazione della fertilità in particolari periodi dell'anno. Questo garantisce la nascita della prole durante la stagione più favorevole, in genere quando le risorse necessarie per sostenere le esigenze di allattamento e post-svezzamento per la crescita della prole sono più abbondanti. L'addomesticamento può avere attenuato o soppresso alcune delle varie espressioni fisiologiche della stagionalità, ma non per i piccoli ruminanti che, la maggior parte di loro, hanno mantenuto questo condizionamento.

La pecora, come la maggior parte delle specie stagionalizzate, usa il fotoperiodo per capire in quale periodo dell'anno si trova. Gli ovini sono caratterizzati dall'avere una stagione riproduttiva di 16-18 giorni di ciclo estrale, che generalmente inizia a fine estate o all' inizio dell' autunno e finisce a fine inverno o inizio primavera.

Da quel momento, ha inizio la stagione anaestrale, senza comportamento e ciclo ovarico. Il fotoperiodo viene tradotto da un sistema foto neuroendocrino composto dalla retina, nucleo soprachiasmatico e dalla ghiandola pineale. Quest'ultima rilascia l'ormone melatonina solamente di notte, in modo che la durata della secrezione varia a seconda della lunghezza del giorno e fornisce una rappresentazione endocrina del fotoperiodo. La melatonina trasmette le informazioni sulla durata del giorno all'asse neuroendocrina-gonadica esercitando un'azione indiretta sul Kiss 1/GPR54, sistema responsabile per il controllo riproduttivo tramite l'asse neurale in accordo con la circolazione delle gonadotropine e i livelli degli steroidi sessuali.

Da prima è stato descritto, e in generale confermato, che la melatonina esercita la sua primaria azione riproduttiva a livello di cervello ed epifisi. Tuttavia, la presenza di alti livelli di melatonina nel liquido follicolare e la presenza di recettori nelle cellule della granulosa suggerisce un ruolo di questo ormone nell' attività ovarica. Questa ipotesi è stata

confermata da diversi e recenti studi che riportano un'importante azione della melatonina sull'ovaio: regolazione della steroidogenesi ovarica (principalmente produzione di progesterone), contributo nel mantenimento di un' appropriata struttura e funzionalità follicolare.

Attualmente, alcuni aspetti dell'azione della melatonina, in vivo, a livello di ciclo ovarico devono essere ancora caratterizzati. In uno studio precedente, abbiamo evidenziato che la somministrazione di melatonina durante l'anaestro modificava le ondate follicolari , aumentando il turnover dei follicoli dominanti.

Il presente studio si pone lo scopo di scoprire gli effetti dell' asportazione della melatonina nella dinamica di crescita dei follicoli e del corpo luteo nella pecora.

4.2 MATERIALI E METODI

4.2.1 PROTOCOLLO SPERIMENTALE

L'approvazione è stata ottenuta dall'Istituto di vigilanza Animale, e tutte le procedure conformate all' Istituto nazionale sulla salute, linee guida e la vigilanza degli animali di laboratorio. Tutti gli animali utilizzati per questi esperimenti erano degli adulti pluripari, pecore di razza sarda, con caratteristiche uniformi (n=11; 2.5-5 anni; peso39.5±7.7 chili) tenute in un paddock con accesso a una struttura interna, e alimentati con fieno e dose costante di mangime, nelle strutture sperimentali del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell' Università si Sassari, Italia (latitudine 40° 43' n). Queste strutture sono a norma rispetto a quanto stabilito dall' Unione Europea per l' Istituzione delle procedure scientifiche.

Tutti gli animali sono stati sottoposti ad esami fisici e neurologici, BC, esami biochimico del siero, esami delle urine. Gli animali considerati non idonei sono stati esclusi dal presente studio. Le pecore sono state divise, secondo metodica random , in due gruppi: a) pinealectomizzate (n=6); b) finte pinealectomizzate (n=5).

La concentrazione sierica di melatonina di questi animali è stata stabilita prima dell'intervento chirurgico , a 60 giorni e 12 mesi dopo l' intervento. Un anno dopo l'intervento, le pecore sono state inserite nell' esperimento per la valutazione dell'

asportazione dell' epifisi sullo stato ovarico. Il periodo di osservazione era compreso tra due consecutive naturali stagioni riproduttive (fine agosto- fine dicembre) descritte per questa specie in questa latitudine. Per poter determinare gli effetti della carenza di melatonina in stagione riproduttiva, è stato determinato lo stato dell' ovaio ogni 7 giorni durante i 365 giorni (a partire dal 22 agosto 2011) tramite ecografia trans rettale. La presenza dell' ovulazione e del ciclo estrale, è stata confermata dalla visualizzazione del corpo luteo.

Per monitorizzare la dinamica di crescita follicolare e del corpo luteo è stata sincronizzata l' ovulazione in tutte le pecore tramite due dosi di 125mg di un analogo della prostaglandina (cloprostenolo, Estrumate, Essex Animal Health, Friesoythe, Germany), a distanza di 10 giorni. Il corpo luteo e lo sviluppo follicolare sono stati osservati tramite sonda trans rettale dopo aver stabilito l' estro tramite arieti vasectomizzati sino alla prossima ovulazione. Inoltre, è stata valutata la funzione delle cellule luteiniche andando a determinare la concentrazione di progesterone nel sangue prelevato dalla vena giugulare.

4.2.2 PROCEDURA CHIRURGICA

La premedicazione, l'induzione, il mantenimento dell' anestesia, il trattamento analgesico e il monitoraggio intraoperatorio.

Le pecore sono state lasciate a digiuno 24h prima dell' intervento ma con libero accesso all' acqua sino a 3-4 h prima della chirurgia. È stato somministrato del Ketoprofene2.0 mg/kg IV (Vet-Ketofen 1%, Merial, Assago, Italia), diazepam 0.4 mg/kg iv (diazepam 0.5%, Intervet GmbH, Unterschleissheim, Germania) e fentanyl 6µg/ kg iv (Fentanest, acatavis, Nerviano, Italia). Cute e sottocute è stato infiltrato con 10ml di mepivacaina 2% (Mepibil, Hospira, Napoli, Italia). Per l' induzione si è somministrato tiopentale sodico (Penthotal, Intervet) 8mg/ kg iv seguito dall' intubazione intratracheale.

Per il mantenimento si è utilizzato il sevoflorano (Sevoflo, Abbott Laboratories, Queenborogough, U.K.) in ossigeno (O_2)/ aria tramite il sistema circolare dei piccoli animali (Fabius GS, DrÄger, Lübeck, Germania).

Gli animali venivano mantenuti tramite ventilazione meccanica e i parametri aggiustati per tenere costante il volume tidalico di CO_2 tra 28e 32 mmHg (moderata iperventilazione).

Della soluzione cristalloide (NaCl 0.9%, Acme, Cavriago, Italia) posta in infusione di 5-10 ml kg/h veniva somministrata come supporto della pressione sanguigna. Dopo la craniettomia, tramite gocciolamento nella dura si è versato 1 ml di mepivacaina 2% 1 minuto prima dell' incisione. Al termine della chirurgia si è somministrato un bolo in iv di buprenorfina 0.02mg/kg (Temgesic, Schering- Plough S.p.A., Segrate, Italia) per garantire un' adeguata algesia postoperatoria e questa procedura è stata ripetuta dopo quattro ore. Poco prima della rimozione del tubo endotracheale si è somministrato iv lidocaina 1mg/kg in bolo (Lidocaina 2%, Fort Dodge, Aprilia, Italia) per evitare un aumento della pressione intracranica.

Pinealectomia

Gli animali sono stati posti in decubito sternale con la testa sollevata non più di 30° rispetto al cuore con la punta del naso verso il basso e tenuta fissa la testa per effettuare la craniectomia.

L'incisione della cute è stata fatta con una linea mediana dorsale di circa 5-7 cm di lunghezza, a partire dal attaccamento prossimale del legamento nucale con direzione rostrale. Il sottocute e la fascia dei muscoli cutanei della testa (m. occipitale e frontale) sono stati divisi medialmente. I sottostanti muscoli cervico scutulare e parieto auricolare sono stati incisi medialmente, divisi, elevati e rettratti con l' auto divaricatore Gelpi per evidenziare la sottostante scatola cranica.

Si è eseguita la craniectomia tramite un sega elettrica circolare. La procedura utilizzata è stataquella descritta da Dempsey et al. (1982). Aprendo la dura madre, la corteccia parieto occipitale, la porzione prossimale del tentorio del cervelletto e, protetto dal margine dell' osso aperto, si è esposto il seno dorsale. Il cervello è stato bagnato da una continuo flusso di soluzione salina. Tramite un divaricatore imbottito inserito nella fessura cerebrale traversale, il lobo parieto occipitale, spostato gentilmente, con movimenti rostrali e laterali, in maniera da esporre la porzione più profonda del tentorio del cervelletto. La volta della cisterna quadrigemina, aperta con un bisturi e fatto drenare il liquor. Inserendo la seconda spatola, si trovano i collicoli rostrali, rostralmente e dorsalmente a questi si localizza l' epifisi. Con l' aiuto di uno scalpello, la ghiandola viene, delicatamente , liberata dai piccoli vasi e dai nervi che la circondano e , ventralmente, dalle vene cerebrali basale ed

interna. Con l'aiuto di un forcipe, si afferra e si estrae l' epifisi. Viene suturata tramite filo sintetico (Graftygen) sopra la dura madre ed il cranio. I muscoli sono stati apposti al centro; il tessuto sottocutaneo e la cute cuciti normalmente. La terapia applicata agli animali: antibiotico per 10 giorni (amoxicillina + ac. Clavulanico 20mg/kg/ die IM) e antiinfiammatorio per 5 giorni. La stessa procedura è stata applicata agli animali falsi pinealectomizzati dove al contrario non è stata rimossa la ghiandola.

4.2.3 Valutazione morfometrica dei follicoli e dinamica di accrescimento del corpo luteo

La presenza e la misurazione del numero e delle dimensioni del corpo luteo e del numero e del diametro dei follicoli maggiori di 2mm veniva determinato in ogni soggetto tramite ultrasonografia trans rettale. Le ecografie avvenivano attraverso l' utilizzo di una sonda lineare elettronica da 7.5 mHz per uso trans rettale(UST-5820-5;Aloka) collegata ad un ecografo Aloka SSD-500. In breve, le osservazioni ecografiche venivano condotte con gli animali in stazione quadrupedale, allo scopo di eliminare eventuali bolle d' aria o zone di non aderenza che causerebbero dannose distorsioni dell' immagine ultrasonica e limiterebbero la trasparenza acustica della sonda, veniva introdotto direttamente nel retto del gel idrosolubile per incrementare la trasmissione degli ultra suoni. La sonda veniva, quindi, posizionata nel retto con il trasduttore orientato perpendicolarmente alla parete addominale. Una volta sorpassata la vescica e localizzate le corna uterine, la sonda veniva ruotata lateralmente di 90° in senso orario e di 180° in senso antiorario in modo da poter localizzare entrambe le ovaie e le loro strutture.

Entrambe le ovaie sono state misurate più volte in diverse angolazioni in modo da poter vedere tutti follicoli con diametro ≥2 mm (durante la fase follicolare) e i corpi lutei (fase luteale). Il maggior diametro dei follicoli e l' area del corpo luteo sono stati misurati tramite un calibro elettronico presente nell' ecografo. La posizione dei follicoli è stata registrata in uno schema delle ovaie per singola pecora. Nei corpi lutei cavitari, la misurazione avveniva calcolando il contorno del corpo luteo e sottraendo l' area della cavità

in modo da avere le dimensioni totali del tessuto luteale.

4.2.4 Dosaggio ELISA del progesterone

La funzionalità delle cellule luteali è stata valutata mediante la determinazione della concentrazione del progesterone (P4) plasmatico, in campioni prelevati subito dopo che sono state eseguite le ecografie, usando provette sotto vuoto conetenenti EDTA come anticoagulante (Vacutainer Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Subito il campione di sangue veniva centrifugato a 1500 g per 10 min e il plasma ottenuto venivastoccato a -20°C sino al momento del dosaggio.

I livelli di P4 sono stati dosati in duplicato usando un Kit commerciale ELISA (DRG Instruments GmbH, D-35039 Marburg, Germany), basato sul principio competitivo.

I pozzetti della micro piastra da 96 sono cottati con anticorpi policlonali diretti contro il sito antigenico del progesterone. In ogni pozzetto veniva aggiunto il campione, contenente il progesterone endogeno, o lo standard e il progesterone coniugato alla per ossidasi di rafano. Nel pozzetto iniziava così la competizione per il sito di legame con l'anticorpo antiprogesterone legato al fondo del pozzetto e dopo una incubazione di un'ora, i pozzetti venivano lavati per eliminare tutto ciò che non era legato.

La quantità di P4 coniugato legato all'anticorpo, veniva visualizzata con l'aggiunta della soluzione di substato (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB), che dopo una incubazione di 15 minuti, portava allo sviluppo del colore blu. La reazione con il substrato veniva stoppata con l'aggiunta di acido solforico (stop solution). L'intensità del colore giallo così ottenuto veniva misurata spettrofotometricamente a 450 nm ed era inversamente proporzionale alla concentrazione del P4 nel campione.

Tutti i reagenti del kit, controlli, standard e campioni stoccati sono stati analizzati dopo essere stati portati a temperatura ambiente (25°C) mezz'ora prima di iniziare il dosaggio.

Tutti i dosaggi sono stati eseguiti utilizzando il Personal Lab Adaltis (Adaltis srl, 00012 Rome, Italy), uno strumento che procede in maniera automatica per i protocolli ELISA.

La sensitività analitica del test era di 0,045 ng/mL e il coeficiente di variazione CV intra- and inte- dosaggio era <10%.

4.2.5 DOSAGGIO DELLA MELATONINA NEL PLASMA

Per la valutazione della concentrazione di melatonina nel plasma, sono stati eseguiti 2 prelievi di sangue dalle vene giugulari: uno a mezzogiorno e l'altro a mezzanotte. I campioni sono stati immediatamente centrifugati e stoccati a -80°C sino al dosaggio. La melatonina è stata dosata come descritto da Zarazagala e altri. In breve, la melatonina è stata dosata usando il metodo diretto RIA con [125I]2-iodomelatonin usata come marker (21) e l'anticorpo anti melatonina (22; melatonin Fluka-63610). Questo dosaggio diretto, descritto da Fraser a altri (23) è stato eseguito applicando le modifiche di Webley et al. [24] and Ravault et al. [25].

100 µL di anticorpo di coniglio anti melatonina (diluizione finale: 1/400,000) and 300 µL di [125I]2-iodomelatonina (15,000 cpm/tubo) sono state aggiunte a 100 µL di tampone di dosaggio (tricina) o di plasma non diluite. Dopo 16-18 ore di incubazione a 4°C, il complesso antigene-anticorpo formato, precipitava all'aggiunta di 1 ml di un anticorpo di pecora antirabbit (INRA). Dopo 1 h di incubazione, i campioni venivano centrifugati (2800 g per 30 min at 4°C), il surnatante veniva scartato e il pellet analizzato su un Gamma counter.

I dosaggi sono stati effettuati basandosi su una curva standard di melatonina (da 4 a 1000 pg/mL) preparata nel plasma delle pecore pinealectomizzate. Tutti i campioni sono stati analizzati nello stesso dosaggio e il coefficiente di variazione l'intra-dosaggio era 12,8%.

4.2.6 Determinazione della capacità antiossidante totale nel plasma

I campioni di sangue prelevati in tubi vacutainer contenenti EDTA come anticoagulante, venivano centrifugati a 1500 g per 10 min e il plasma recuperato, conservato a -80°C sino al dosaggio.

La capacità antiossidante totale nel plasma è stata determinata usando il metodo descritto da Re e altri (26).

In breve, una soluzione di ABTS·+ è stata preparata sciogliendo 19,5 mg di 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS; Sigma, Deisenhofen, Germany) e 3,3 mg di potassio per solfato (Dipotassium peroxodisulphate; Sigma) in 7 ml di tampone fosfato

0,1M, pH 7,4. Questa soluzione è stata conservata al buio per 12 ore e poco prima del dosaggio diluita (approssimativamente 1:80) in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4, sino ad ottenere un'assorbanza di circa 1,0 alla lunghezza d'onda di 734 nm. Il campione è stato diluito 1:50 in tampone fosfato 0,1M pH 7,4 e l'assorbanza è stata misurata in doppio in uno spettrofotometro Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer a 734 nm, 5 minuti dopo aver aggiunto il campione alla soluzione di ABTS·+. Il decremento dell'assorbanza dell'ABTS·+ in presenza del campione è proporzionale alla capacità antiossidante del campione stesso ed è stata espressa come capacità antiossidante trolox equivalente (Trolox Equivalent Anti-Oxidant Capacity (TEAC)) e cioè concentrazione di trolox che produce lo stesso effetto antiossidante del campione studiato. Il calcolo è stato eseguito sulla base di una curva standard di soluzione di trolox 5, 10, 15 20 µM.

4.2.7 ANALISI STATISTICA

Per analizzare le differenze sull' ondate di crescita follicolare, numero di follicoli, e funzionalità del corpo luteo, i dati sono stati normalizzati rispetto al giorno in cui è stata rilevata l'ovulazione. In primo luogo, i dati ecografici durante il ciclo estrale indotto sono stati riassunti per caratterizzare i modelli di sviluppo dei follicoli ovarici. Tutti i follicoli rilevati mediante ecografia sono stati classificati in base al loro diametro più grande e, successivamente, sono stati raggruppati come totali (≥ 2 mm), grandi (≥ 4 mm), o follicoli piccoli (2-3 mm). In secondo luogo, i dati ottenuti tramite plasma ed ecografia durante la fase luteale sono state riassunti per caratterizzare i modelli di dinamica di crescita e funzionalità del CL.

I dati sulla crescita individuale del follicolo dominante sono stati usati per caratterizzare le ondate follicolari sulla base di (a) insorgenza dell' ondata (emergenza): giorno in cui follicoli sono stati dapprima rilevati a 3 mm, (b) fase di crescita (lunghezza): definita come il tempo che ha un singolo follicolo di crescere da 3 mm al suo diametro massimo; (c) fase di regressione: il tempo impiegato da un singolo follicolo di regredire dalla sua dimensione massima fino al giorno in cui essa raggiunge la sua dimensione più piccola, (d) fine dell' ondata: giorno in cui il follicolo dominante termina la sua fase di regressione, (e) la durata dell'ondata (lunghezza totale): tempo impiegato da un singolo follicolo di

crescere da 3 mm al suo diametro massimo e di regredire del tutto alla sua dimensione minima.

Effetti del giorno e ondata di sviluppo follicolare sulle caratteristiche individuali del follicolo dominante durante lo studio sono stati valutati mediante ANOVA.

Effetti dell' assenza di melatonina sulla durata della stagione riproduttiva, sul numero e dimensioni dei follicoli, sulle dimensione CL, sulle concentrazioni ormonali, e sui valori TEAC stati analizzati mediante una ANOVA split-plot, seguito da un test di Kruskal-Wallis, quando il test di Levene mostrava che le variabili non erano omogenee. Il test di Duncan è stato utilizzato per l'interazione significativa L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software statistico Statgraphic Centurion XV (versione 15.2.06 per Windows; StatPoint, Inc., Herndon, VA, USA) e una probabilità di $P \geq 0,05$ è stato considerato il livello minimo di significatività. Tutti i risultati sono stati espressi come media ± SEM.

4.3 RISULTATI

Il dosaggio della melatonina nel plasma ha confermato la rimozione chirurgica dell' epifisi nelle pecore pinealectomizzate (figura 1). La concentrazione di melatonina durante il giorno non differisce tra i due gruppi, con valori < 4pg/ml. In seguito all'intervento, i valori notturni rimangono invariati in quelle senza epifisi e sono significativamente più bassi rispetto al gruppo di pecore controllo ($p<0.01$).

La mancanza di melatonina condiziona la stagionalità riproduttiva. Le pecore senza epifisi manifestano un allungamento della stagione riproduttiva rispetto a quelle con epifisi (310 ± 24.7 vs 217.5 ± 24.7 day, rispettivamente; $p<0.05$). Due pecore pinealectomizzate sono risultate cicliche per tutto l' arco dell' anno.

Lo studio ultrasonografico ha mostrato in entrambi i gruppi un modello ben definito di dinamica follicolare (figura 2); comunque, ci sono delle differenze significative nelle caratteristiche delle ondate follicolari (tabella 1).

Tabella 1. Caratteristiche dell'ondata folliculare nelle pinealectomizzate (n=6) e controllo (n=6) durante un ciclo estrale indotto in epoca riproduttiva.

	Controllo (mean ± SE)	Pineapinealectomizzate (mean ± SE)
Nunero di ondate follicolari	5.2 ± 0.2[a]	4.3 ± 0.2[b]
Lunghezza delle ondate follicolari (giorni)	6.1 ± 0.3[a]	7.2 ± 0.3[b]
Diametro massimo raggiunto da DF (mm)	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.1
DF tasso di crescita (mm/giorno)	0.74 ± 0.05	0.69 ± 0.05
DF tasso di regressione (mm/giorno)	1.4 ± 0.1	1.4 ± 0.1

DF fase di crescita (giorni)	3.9 ± 0.2	4.5 ± 0.2
DF fase di regressione (giorni)	1.8 ± 0.2	2.4 ± 0.2

Nella stessa riga, differenti lettere indicano differenza statistica (ANOVA a ≠ b: P < 0.05)

DF, follicolo dominante.

L'asportazione dell' epifisi ha causato meno ondate durante il ciclo estrale (4.3 ± 0.2 versus 5.2 ± 0.3; P < 0.05) perché le ondate duravano un giorno in più rispetto al controllo (P < 0.05).

Analizzando passo a passo le diverse ondate durante il ciclo estrale, si è osservato che le ondate follicolari erano in numero di tre (8.2 ± 0.8 giorni) e quattro (8.3 ± 0.8 giorni) (figura3). In particolare la loro durata era maggiore sia durante l' ondata ovulatoria (5.2 ± 0.5 giorni; p<0.05) sia nelle rispettive ondate follicolari nel controllo (3^{rd} ondata: 6 ± 0.9 giorni; 4^{th} ondata: 5.8 ± 0.6 giorni, p<0.05). Inoltre, la fase di regressione del prima ondata follicolare risultava più lunga nelle pecore senza epifisi rispetto al controllo (2 ± 0.2 vs 1.1 ± 0.2, rispettivamente; p<0.05). In contrasto alle pinealectomizzate, nelle pecore controllo non si notavano differenze per quanto riguarda la durata del follicolo dominante durante la fase di crescita nel ciclo estrale, il follicolo ovulatorio aveva più tempo (5.5 ± 0.4 giorni) per raggiungere il suo massimo diametro rispetto agli altri follicoli che sviluppano durante la fase luteinica (1^{st} ondata: 3.3 ± 0.5 giorni; 2^{nd} ondata: 4.3 ± 0.5; 3^{rd} ondata: 3.6 ± 0.5; 4^{th} ondata: 3.5 ± 0.5; p<0.05). Non sono state riscontrate delle differenze tra i due gruppi, per quanto riguarda le caratteristiche delle ondate ovulatorie.

Si è inoltre riscontrata una variazione tra i due gruppi sperimentali nel numero dei follicoli piccoli (2-3 mm di diametro), grandi (≥ 4 mm) e follicoli totali durante il ciclo estrale (figura 4). In particolare, nel controllo, il numero dei follicoli piccoli, grandi e il numero dei follicoli totali aumentava durante la fase luteale, con un picco intorno al giorno 10- 15 del ciclo estrale, per poi diminuire durante la fase follicolare (p<0.05). Nelle pinealectomizzate lo sviluppo dei follicoli non è stato omogeneo tra le diverse categorie sopra descritte. I follicoli di piccolo dimensioni avevano un picco di crescita nei primissimi giorni della fase luteale, verso la fine della fase luteale (giorni 9-15) e nei primissimi giorni di quella follicolare.

Allo stesso modo non è stato possibile stabilire un modello di crescita per quanto

riguarda i follicoli di grandi dimensioni in quanto sono stati osservati dei picchi nei giorni 0, 5, 6, 9, 11-15, e 19 ($p<0.01$). Lo stesso accadeva per quanto riguarda il numero dei follicoli totali ($p<0,001$). Inoltre, il numero medio di follicoli appartenenti alle diverse categorie differiva tra i due gruppi sperimentali.

I follicoli di piccole dimensioni erano maggiori nelle pecore senza epifisi rispetto a quelle controllo (13.5 ± 0.3 vs 12.2 ± 0.3; $p<0.01$), e questa differenza si palesava nei giorni 2 e 4 del ciclo estrale quando i dati sono stati analizzati giorno per giorno. Invece, il numero di follicoli di grandi dimensioni è risultato maggiore nel gruppo controllo (2.7 ± 0.1 vs 2.3 ± 0.1; $p<0.0001$), e lo si osservava maggiormente nelle giornate 2,4 e 10 del ciclo estrale.

Nessuna differenza è stata registrata nel numero medio di follicoli totali, mentre l'analisi dei dati fatta giorno per giorno ha mostrato che si aveva un numero maggiore di follicoli nelle pecore pinealectomizate durante i primi giorni del ciclo estrale (giorni 0, 2 e 4; $p <0,05$).

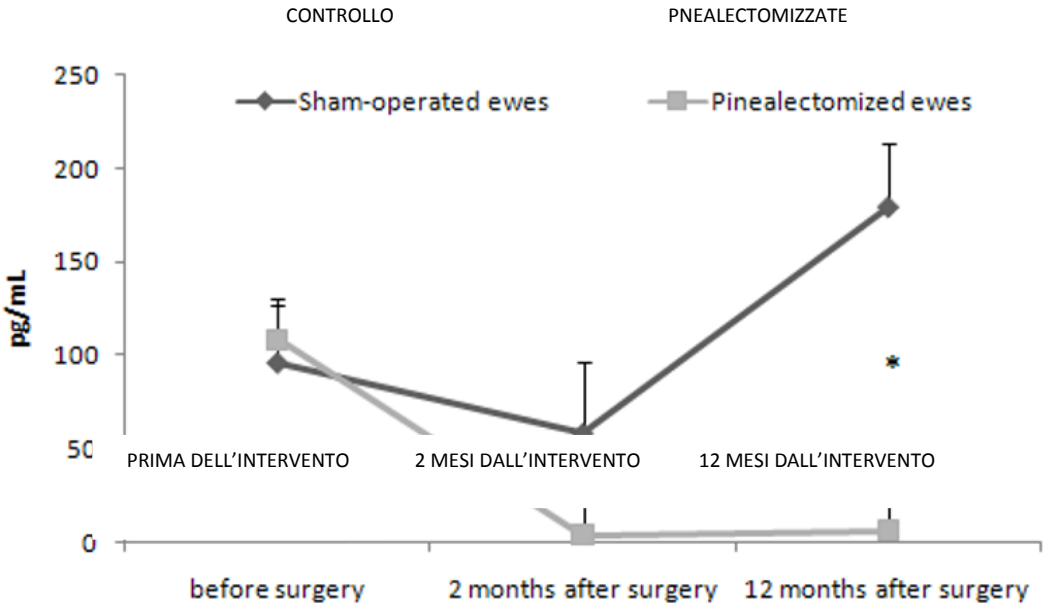
La stessa area del corpo luteo misurata tramite ecografo risultava significativamente più piccola nelle pecore senza epifisi rispetto a quelle con epifisi (65.4 ± 5.9 vs 105.4 ± 5.9 mm^2; $p<0.0001$), e questa differenza si notava a nei giorni 6,8 e 14 del ciclo quando i dati sono stati analizzati giorno per giorno (figura 5).

Queste differenze sono state confermate dal dosaggio del progesterone, dove si osservavano concentrazioni inferiori dell'ormone nelle pecore pinealectomizzate (4.9 ± 0.6 vs 7.1 ± 0.7 ng/mL; $p<0.05$).

I valori della TEAC sono stati significativamente bassi nelle pecore senza epifisi($p<0.01$); (figura 6). Non sono state osservate delle differenze nei due gruppi sperimentali quando i dati sono stati analizzati mese per mese.

FIGURE

Figura 1. Concentrazione melatonina di notte (i prelievi di sangue sono stati effettuati alle 24.00) nei controlli (n=6) e nelle pecore pinealectomizzate (n=6) prima e 2 e 12 mesi dall' intervento chirurgico



*Indica una differenza statisticamente significativa tra il controllo e le pecore pinealectomizzate (ANOVA $p<0.05$).

Figura 2. Esempio di un modello di ondata nella dinamica follicolare nelle pecore controllo ed in quelle pinealectomizzate durante un ciclo estrale in stagione riproduttiva

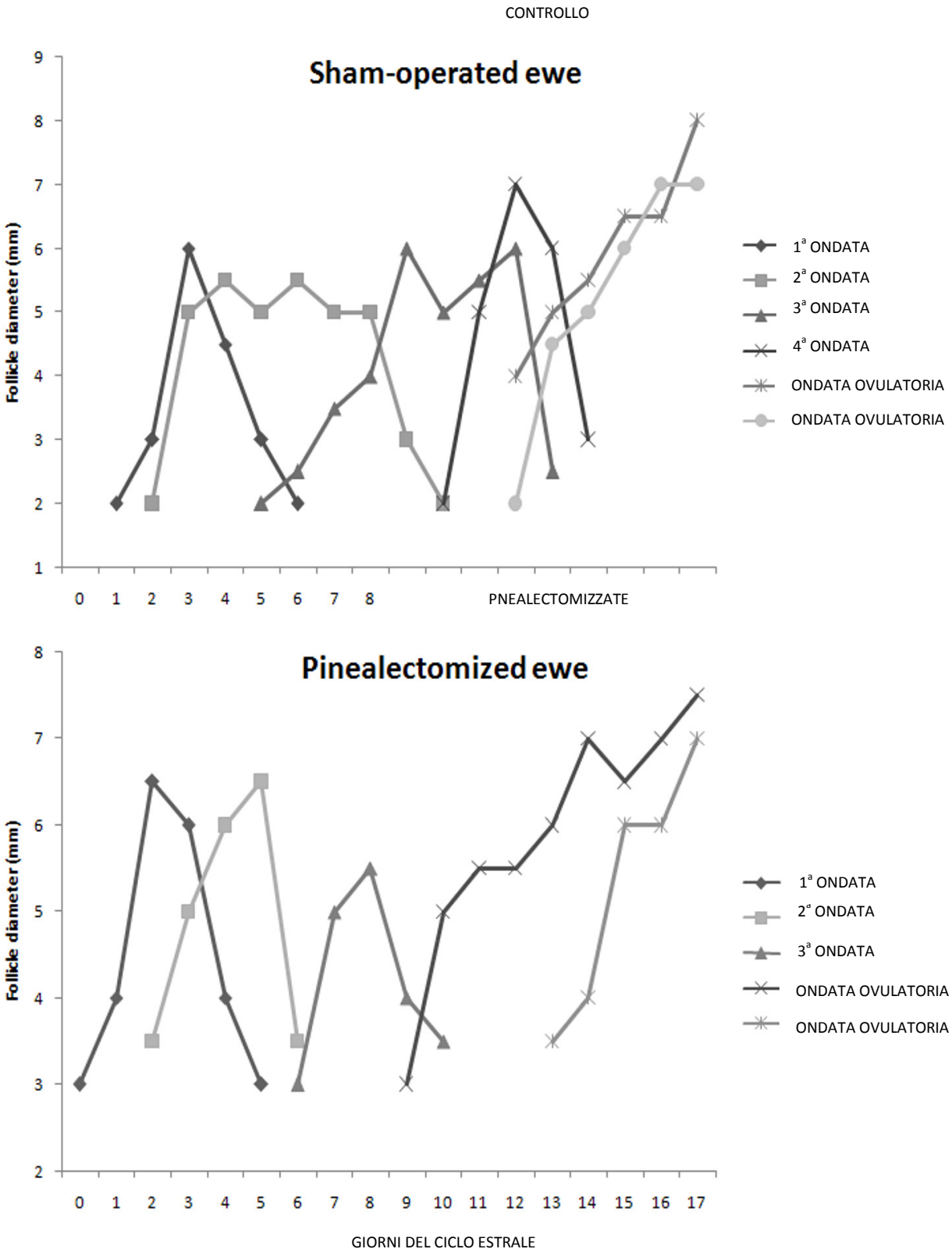
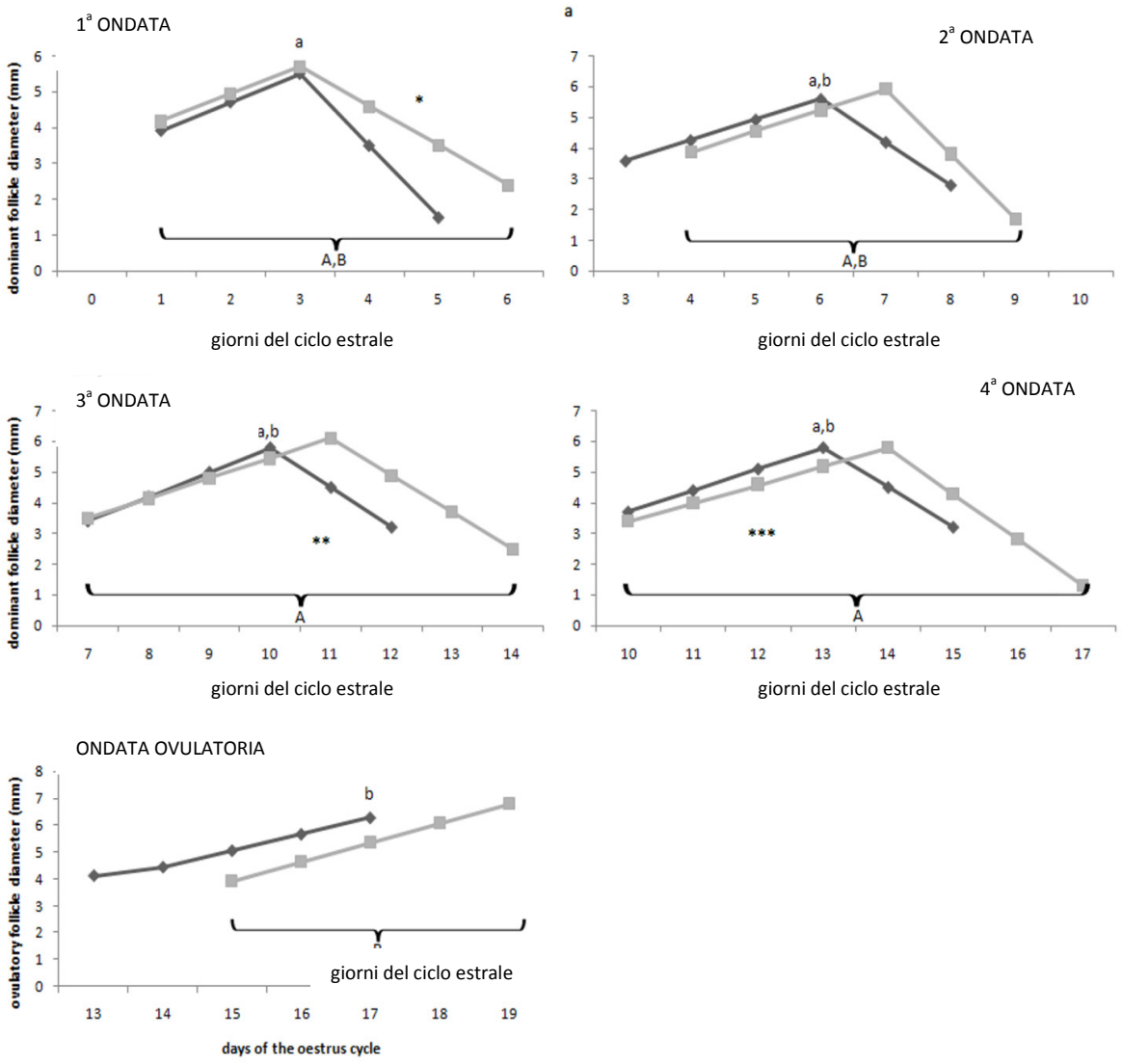


Figura 3. Differenze nelle caratteristiche delle ondate follicolari nel controllo e nelle pinealectomizate durante un ciclo estrale indotto in epoca riproduttiva



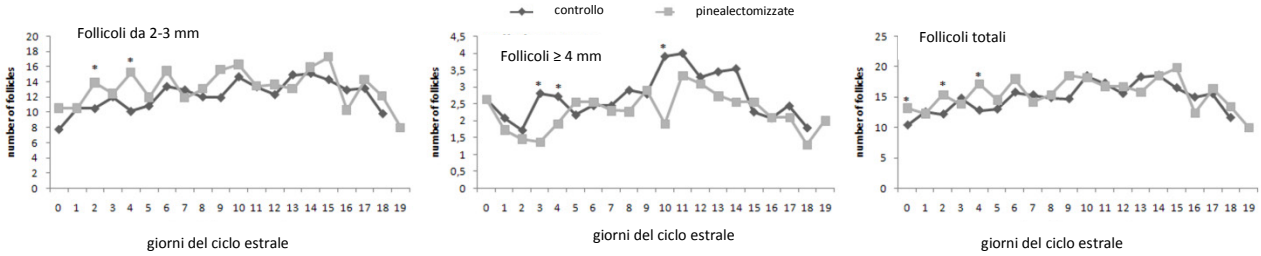
* Indicano differenze nel tasso di regressione tra i gruppi sperimentali: ANOVA one way p<0,01

** Indicano differenze nelle lunghezze tra i gruppi sperimentali: ANOVA one way p<0,05

*** Indicano differenze sia nella durata dell' ondata sia nel tasso di crescita tra i gruppi sperimentali: ANOVA one way p<0,05

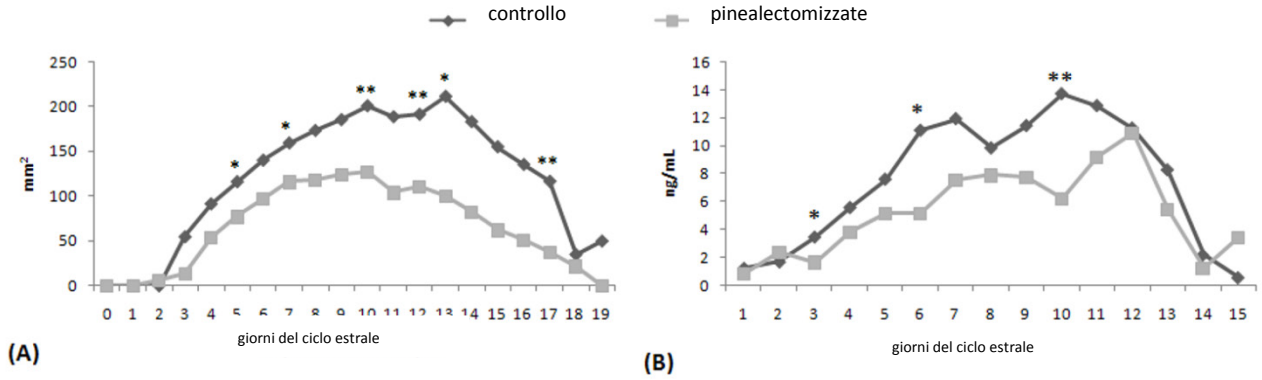
Differenti lettere indicano differenze statistiche tra le caratteristiche dell' ondata nei gruppi : lettere minuscole nel controllo indicano differenze nel diametro massimo dei follicoli; le lettere maiuscole indicano differenze nella durata dell' ondata nel gruupo senza epifisi (ANOVA one way p<0,05)

Figura 4. Numero di piccoli (2-3 mm di diametro), grandi (≥ 4 mm) follicoli totali nelle pecore controllo and pinealectomizzate durante un ciclo estrale indotto in stagione riproduttiva.



* Indicano differenze statisticamente significative tra il guppo controllo e quello senza epifisi (ANOVA p<0.05).

Figura 5. Area media del corpo luteo (A) e livelli plasmatici del progesterone (B) nel gruppo controllo e in quello senza epifisi durante un ciclo estrale estrale indotta in stagione riproduttiva.



* Indicano una differenza significativa tra il gruppo controllo e senza epifisi . (ANOVA p<0.05).

4.4 DISCUSSIONE

Dall'osservazione dei dati ottenuti da questo lavoro possiamo trarre diverse conclusioni. La prima è che questo lavoro ha evidenziato per la prima volta che la mancanza di melatonina può avere degli effetti a livello di ondate di crescita follicolare durante il ciclo estrale. La seconda è che tali effetti si evidenziano anche nello sviluppo e nella funzione del corpo luteo, in termini di produzione di progesterone. La terza, è che il nostro lavoro conferma degli studi fatti in precedenza in cui si affermava che la pinealectomia alterava la stagionalità riproduttiva in specie stagionalizzate [27]

La melatonina gioca un ruolo determinante nella regolazione della stagione riproduttiva nei mammiferi.

Primi studi sulla pecora, e sugli altri mammiferi che manifestano ritmi circannuali, mostravano che l' eliminazione della secrezione circadiana della melatonina in seguito ad asportazione dell' epifisi alterava la risposta al fotoperiodo dal punto di vista riproduttivo e provocando ritmi circannuali irregolari e quindi senza controllo [28-30].

Diversi autori hanno descritto che la pinealectomia abolisce la risposta stagionale, mentre la somministrazione della melatonina la ripristina [28, 31, 32]. Il nostro studio pone in evidenza la significativa estensione della stagione riproduttiva nelle pecore senza epifisi, con due di queste che addirittura ciclavano durante tutto l' anno.

In tutte le fasi della stagione riproduttiva e durante l' anaestro , la crescita dei follicoli antrali mostra nella pecora un modello ondulatorio distinto [33, 34]. Durante il periodo riproduttivo, sia nelle specie prolifiche che non, si hanno tipicamente 3 o 4 ondate follicolari nell' intervello ovulatorio [35]). Questo modello di sviluppo del follicolo antrale è unicamente legato al periodico innalzamento delle concentrazioni sieriche dell' FSH; picchi di incrementi transitori delle concentrazioni giornaliere di FSH si evidenziano prima dell'inizio di una nuova ondata follicolare [36].

Nel nostro studio studio, l'asportazione dell' epifisi non ha modificato il modello di sviluppo follicolare, poiché le pecore pinealectomizzate hanno mostrato un ben definito modello di dinamica ondulatoria follicolare. D' altra parte la privazione di melatonina ha alterato invece lo sviluppo del follicolo, con un inferiore numero di ondate follicolari e una loro maggiore durata. Questo risultato conferma un precedente studio fatto sul trattamento

della melatonina nella capra durante l' anaestro dove si notava un aumentato del turnover dei follicoli dominanti, per effetto di un accorciamento del periodo di sviluppo, riducendo così la durata dell' ondata follicolare [14].

È stato visto che la melatonina regola la secrezione pulsatile del GnRH dall' ipotalamo e quindi anche la secrezione di FSH/LH[37] favorendo così lo sviluppo del follicolo. Dati recenti ci suggeriscono che nelle specie stagionalizzate la melatonina potrebbe agire sulle cellule KiSS-1 per regolare l' attività riproduttiva (for review see: [38]). Nelle pecore che si riproducono con foto periodo negativo, si nota con grande evidenza che la secrezione di melatonina regola l' espressione del KiSS-1 mRNA nel nucleo Arcuato [39].

Considerando che le KiSS peptine suscitano la secrezione di FSH/LH [40, 41], l' attivazione di questa via endocrina potrebbe creare un ambiente ormonale più adatto per la crescita del follicolo, e questo potrebbe spiegare il basso tasso di sviluppo del follicolo in pecore pinealectomizzate.

Dobbiamo ricordare che le gonadotropine lavorano in concerto con i fattori di crescita prodotti localmente, come l' insulin-like growth factors (IGFs), che promuove e regola lo sviluppo follicolare. L' Insulin-like growth factors sono dei peptidi mitogenici e antiapoptotici prodotti dalle cellule della granulosa e da quelle della teca durante lo sviluppo follicolare. Questi fattori stimolano la sintesi del DNA e la secrezione dell' estradiolo e del progesterone dalle cellule della granulosa e dalle cellule luteali. [42]. È stato dimostrato che la melatonina stimola la produzione da parte delle cellule della granulosa umane poste in coltura di IGF-I [43]. Pertanto, l'alterazione nell'azione del IGF-I potrebbe anche contribuire ad un minor percentuale di sviluppo follicolare nelle pecore senza epifisi.

Lo scarso sviluppo dei follicoli potrebbe inoltre risultare in una inadeguata crescita del corpo luteo [44, 45].

È un dato di fatto che l' ovulazione nelle pecore pinealectomizzate porta alla formazione di un corpo luteo più piccolo, con la conseguente inferiore produzione di progesterone rispetto al controllo. La scarsa funzione del corpo luteo può essere spiegata dall' azione, sia diretta che indiretta, della melatonina sulle cellule luteiniche. Come sopra descritto, la melatonina stimola la secrezione di LH/FSH.

L' LH regola tutta una serie di funzioni ovariche, sebbene il suo effetto principale sia quello di stimolare la produzione di progesterone dal corpo luteo. Infatti l' LH stimola intensamente la produzione di progesterone nelle cellule luteiniche poste in coltura nel

bovino [46],e svolge un ruolo luteo protettivo aumentando la vitalità delle cellule luteali. [47].

La melatonina esercita un' azione diretta sul corpo luteo. Sono stati rilevati siti di legame della melatonina nelle cellule della granulosa e luteiniche umane[7, 9], e bovine[10]. Studi precedenti avevano dimostrato che la melatonina aumenta significativamente la produzione in coltura in vitro di cellule della granulosa sia bovine che umane.[48] .

Allo stesso modo, questo effetto è stato visto in altre specie, ratto e pecora compresi[49, 50]. Al contrario altri studi hanno evidenziato degli effetti negativi della melatonina nei confronti della produzione di progesterone nello sviluppo e nella luteinizzazione delle cellule della granulosa, o addirittura nessun effetto. [43, 51-54].

La comprensione degli effetti che in vitro la melatonina è in grado di esplicare sulla steroidogenesi risulta essere complicata e sembra dipendere da diversi fattori: i tipi cellulari (cellule della teca o della granulosa), la durata del trattamento (risposta a breve o lungo termine), i modelli sperimentali utlizzati (cellule in coltura o follicoli in coltura), la specie, il dosaggio e i diversi media di coltura [55].

Studi in vivo hanno mostrato che la melatonina stimola la produzione di progesterone sia nella pecora [50] che nel ratto [12, 56, 57]. Questo viene confermato dai dati ottenuti nel presente studio, che ci mostrano che, sia la produzione di progesterone che lo sviluppo del corpo luteo, è compromessa nelle pecore pinealectomizzate. Tale risultato può essere spiegato considerando che la melatonina aumenta notevolmente i recettori per l' espressione dell' mRNA per l' LH (ma non per l' FSH) nelle cellule della granulosa-luteiniche della donna[9]. Inoltre, grazie alle sue conosciute proprietà antiossidanti, la melatonina agisce direttamente come scavenger contro i radicali liberi riducendo lo stress ossidativo a livello ovarico., Queste azioni benefiche si hanno senza alcuna interazione con i recettori.

Tra le altre funzioni antiossidanti della melatonina si ha quella in presenza di indolo che va a stimolare gli enzimi (superossido dismutasi, glutatione perossidasi e catalasi) che metabolizzano i radicali liberi in maniera da diminuire i prodotti tossici a livello di cellule della teca, cellule della granulosa e liquido follicolare [16]. Tramite queste azioni, la melatonina riduce il danno da radicali liberi, e mantiene i follicoli in ottimo stato funzionale.

Nel presente studio si mette in evidenza un ridotta capacità antiossidante totale nelle pecore senza epifisi rispetto al gruppo controllo, confermando così studi precedenti che riportavano una relazione diretta tra i livelli di melatonina nel plasma e la capacità

antiossidante totale del siero [58-60]. Questi risultati potrebbero spiegare la diminuita attività follicolare e del corpo luteo nelle pecore senza epifisi.

In particolare, l'azione antiossidante della melatonina risulta particolarmente importante al momento dell' ovulazione e della formazione del corpo luteo [15]. Sembrerebbe che la melatonina protegga il corpo luteo dai ROS (reactive oxygen species) e inoltre svolga un importante ruolo nel mantenere attivo il corpo luteo. Si è osservato che i ROS inibiscono la produzione di progesterone nelle cellule luteali attraverso l' inibizione degli enzimi steroidogenici [61] e coinvolgendo le proteine di trasporto intracellulari del colesterolo nei mitocondri [62].

I ROS alterano le membrane plasmatiche delle cellule luteiniche a causa della perossidazione dei lipidi, di conseguenza il danno alle membrane indurrà la regressione del corpo luteo [63, 64]. In questo modo, la melatonina previene l' apoptosi delle cellule della granulosa del bovino poste in coltura in vitro [10]. Per concludere, il monitoraggio ecografico in pecore pinealectomizzate si è dimostrato un utile modello sperimentale per lo studio e la maggiore comprensione dell' attività della melatonina sull'asse riproduttivo. Infatti ciò ha permesso di evidenziare oltre al classico effetto che questo ormone esercita sulla regolazione stagionale della riproduzione nelle specie a fotoperiodo negativo, un' azione sulle strutture funzionali dell'ovaio, quali follicoli e corpo luteo. Dai dati ottenuti si è anche osservato che la carenza di melatonina causa una riduzione della capacità antiossidante totale del siero ed altera la dinamica di crescita sia dei follicoli che del corpo luteo, con una diminuzione del numero di ondate follicolari per ciclo e una diminuzione delle dimensioni del corpo luteo. Questo ovviamente influisce negativamente sulla quantità di progesterone prodotto dalle cellule luteali. Tutti questi dati supportano l'ipotesi che la melatonina svolga un ruolo chiave non solo sulla sincronizzazione della stagione riproduttiva ma anche sulla funzionalità dell' ovaio.

4.5 BIBLIOGRAFIA

1. Ortavant R, Pelletier J, Ravault JP et al. Photoperiod: main proximal and distal factor of the circannual cycle of reproduction in farm mammals. Oxford reviews of reproductive biology 1985; 7:305-345.

2. Malpaux B, Migaud M, Tricoire H et al. Biology of mammalian photoperiodism and the critical role of the pineal gland and melatonin. J Biol Rhythms 2001; 16:336-47.

3. Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. In: Pharmacol Rev, United States, 2003; pp. 325-95.

4. Revel F, Ansel L, Klosen P et al. Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 2007; 8:57-65.

5. Brzezinski A, Seibel MM, Lynch HJ et al. Melatonin in human preovulatory follicular fluid. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 1987; 64:865-867.

6. Soares JM, JR., Masana MI, Ersahin C et al. Functional melatonin receptors in rat ovaries at various stages of the estrous cycle. In: J Pharmacol Exp Ther, United States, 2003; pp. 694-702.

7. Yie SM, Niles LP, Younglai EV Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:1747-9.

8. Niles LP, Wang J, Shen L et al. Melatonin receptor mRNA expression in human granulosa cells. In: Mol Cell Endocrinol, Ireland, 1999; pp. 107-10.

9. Woo MM, Tai CJ, Kang SK et al. Direct action of melatonin in human granulosa-luteal cells. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:4789-97.

10. Wang SJ, Liu WJ, Wu CJ et al. Melatonin suppresses apoptosis and stimulates progesterone production by bovine granulosa cells via its receptors (MT1 and MT2). Theriogenology 2012; 78:1517-1526.

11. Taketani T, Tamura H, Takasaki A et al. Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. Journal of Pineal Research 2011; 51:207-213.

12. Maganhin CC, Fuchs LFP, Simões RS et al. Effects of melatonin on ovarian follicles. European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2013; 166:178-184.

13. Soares JR JM, Sim, Otilde et al. Pinealectomy changes rat ovarian interstitial cell morphology and decreases progesterone receptor expression. Gynecological Endocrinology 2003; 17:115-123.

14. Berlinguer F, Leoni GG, Succu S et al. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. Journal of Pineal Research 2009; 46:383-391.

15. Tamura H, Takasaki A, Taketani T et al. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. In: Endocr J, Japan, 2013; pp. 1-13.

16. Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC et al. Peripheral reproductive organ health and melatonin: Ready for prime time. International Journal of Molecular Sciences 2013; 14:7231-7272.

17. Tamura H, Takasaki A, Miwa I et al. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate.

Journal of Pineal Research 2008; 44:280-287.

18. Dempsey RJ, Hopkins J, Bittman EL et al. Total pinealectomy by an occipital parasagittal approach in sheep. Surg Neurol 1982; 18:377-80.

19. Gonzalez-Bulnes A, Pallares P, Vazquez MI Ultrasonographic Imaging in Small Ruminant Reproduction. Reproduction in Domestic Animals 2010; 45:9-20.

20. Zarazaga LA, Celi I, Guzmán JL et al. Melatonin concentrations in the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats. Theriogenology 2010; 74:221-228.

21. Vakkuri O, Leppaluoto J, Vuolteenaho O Development and validation of a melatonin radioimmunoassay using radioiodinated melatonin as tracer. Acta Endocrinologica 1984; 106:152-157.

22. Tillet Y, Ravault JP, Selve C et al. Immunohistochemical visualization of serotonin and melatonin in the sheep pineal gland using specific antibodies. Conditions d'utilisation d'anticorps specifiques pour la visualisation immunohistochimique de la serotonine et de la melatonine dans la glande pineale du mouton 1986; 303:77-82.

23. Fraser S, Cowen P, Franklin M et al. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. Clinical Chemistry 1983; 29:396-397.

24. Webley GE, Mehl H, Willey KP Validation of a sensitive direct assay for melatonin for investigation of circadian rhythms in different species. Journal of Endocrinology 1985; 106:387-394.

25. Ravault JP, Arendt J, Tobler I et al. Entrainment of melatonin rhythms in rams by symmetrical light-dark cycles of different period length. Chronobiology International 1989; 6:329-339.

26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine 1999; 26:1231-1237.

27. Dardente H Melatonin-Dependent Timing of Seasonal Reproduction by the Pars Tuberalis: Pivotal Roles for Long Daylengths and Thyroid Hormones. Journal of Neuroendocrinology 2012; 24:249-266.

28. Woodfill CJ, Wayne NL, Moenter SM et al. Photoperiodic synchronization of a circannual reproductive rhythm in sheep: identification of season-specific time cues. Biol Reprod 1994; 50:965-76.

29. Zucker I Pineal gland influences period of circannual rhythms of ground squirrels. The American journal of physiology 1985; 249:R111-115.

30. Herbert J, Stacey PM, Thorpe DH Recurrent breeding seasons in pinealectomized or optic-nerve-sectioned ferrets. Journal of Endocrinology 1978; 78:389-397.

31. Reiter RJ, De Los Santos R, Dinh DT et al. Melatonin inhibition of reproduction in pinealectomized male Syrian hamsters: Effects of various hypothalamic cuts. Anatomical Record 1980; 196.

32. Arendt J Melatonin and the pineal gland: Influence on mammalian seasonal and circadian physiology. Reviews of Reproduction 1998; 3:13-22.

33. Evans AC, Duffy P, Hynes N et al. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. In: Theriogenology, United States, 2000; pp. 699-715.

34. Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ et al. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. J Reprod Fertil 1998; 113:275-85.

35. Bartlewski PM, Baby TE, Giffin JL Reproductive cycles in sheep. Animal Reproduction Science 2011; 124:259-268.

36. Bartlewski PM, Beard AP, Rawlings NC. An ultrasound-aided study of temporal relationships between the patterns of LH/FSH secretion, development of ovulatory-sized antral follicles and formation of corpora lutea in ewes. In: Theriogenology, United States, 2000; pp. 229-45.

37. Bronson FH Seasonal variation in human reproduction: Environmental factors. Quarterly Review of Biology 1995; 70:141-164.

38. Revel FG, Ansel L, Klosen P et al. Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders 2007; 8:57-65.

39. Smith JT The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep. Domestic Animal Endocrinology 2012; 43:75-84.

40. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. In: J Neuroendocrinol, England, 2004; pp. 850-8.

41. Messager S, Chatzidaki EE, Ma D et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. In: Proc Natl Acad Sci U S A, United States, 2005; pp. 1761-6.

42. Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z et al. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. Endocr Rev 1999; 20:535-82.

43. Schaeffer HJ, Sirotkin AV Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. Exp Clin Endocrinol Diabetes 1997; 105:109-12.

44. Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN et al. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenology 2001; 56:307-314.

45. Jimenez-Krassel F, FOLGER JK, Ireland JLH et al. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during estrous cycles in cattle. Biology of Reproduction 2009; 80:1272-1281.

46. Juengel JL, Niswender GD Molecular regulation of luteal progesterone synthesis in domestic ruminants. J Reprod Fertil Suppl 1999; 54:193-205.

47. Kawaguchi S, Sakumoto R, Okuda K. Induction of the Expressions of Antioxidant Enzymes by Luteinizing Hormone in the Bovine Corpus Luteum. In: J Reprod Dev, 2013.

48. Webley GE, Luck MR Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. J Reprod Fertil 1986; 78:711-7.

49. Adriaens I, Jacquet P, Cortvrindt R et al. Melatonin has dose-dependent effects on folliculogenesis, oocyte maturation capacity and steroidogenesis. Toxicology 2006; 228:333-343.

50. Durotoye LA, Webley GE, Rodway RG. Stimulation of the production of progesterone by the corpus luteum of the ewe by the perfusion of melatonin in vivo and by treatment of granulosa cells with melatonin in vitro. In: Res Vet Sci, England, 1997; pp. 87-91.

51. Nakamura Y, Tamura H, Takayama H et al. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. In: Fertil Steril, United States, 2003; pp. 1012-6.

52. Murayama T, Kawashima M, Takahashi T et al. Direct action of melatonin on hen ovarian granulosa cells to lower responsiveness to luteinizing hormone. Proc Soc Exp Biol Med

1997; 215:386-92.

53. Sirotkin AV Direct influence of melatonin on steroid, nonapeptide hormones, and cyclic nucleotide secretion by granulosa cells isolated from porcine ovaries. J Pineal Res 1994; 17:112-7.

54. Bodis J, Koppan M, Kornya L et al. Influence of melatonin on basal and gonadotropin-stimulated progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells and in the superfused granulosa cell system. In: Gynecol Obstet Invest, 2001 S. Karger AG, Basel, Switzerland, 2001; pp. 198-202.

55. Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A et al. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. Fertility and Sterility 2009; 92:328-343.

56. Dair EL, Simoes RS, Simoes MJ et al. Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. In: Fertil Steril, United States, 2008; pp. 1299-305.

57. Romeu LRG, DA Motta ELA, Maganhin CC et al. Effects of melatonin on histomorphology and on the expression of steroid receptors, VEGF, and PCNA in ovaries of pinealectomized female rats. Fertility and Sterility 2011; 95:1379-1384.

58. Benot S, Goberna R, Reiter RJ et al. Physiological levels of melatonin contribute to the antioxidant capacity of human serum. Journal of Pineal Research 1999; 27:59-64.

59. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX Melatonin in walnuts: Influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood. Nutrition 2005; 21:920-924.

60. Benot S, Molinero P, Soutto M et al. Circadian variations in the rat serum total antioxidant status: Correlation with melatonin levels. Journal of Pineal Research 1998; 25:1-4.

61. Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL et al. Oxidative stress and the ovary. In: J Soc Gynecol Investig, United States, 2001; pp. S40-2.

62. Behrman HR, Aten RF Evidence that hydrogen peroxide blocks hormone-sensitive cholesterol transport into mitochondria of rat luteal cells. Endocrinology 1991; 128:2958-66.

63. Gatzuli E, Aten RF, Behrman HR Inhibition of gonadotropin action and progesterone synthesis by xanthine oxidase in rat luteal cells. Endocrinology 1991; 128:2253-8.

64. Vega M, Carrasco I, Castillo T et al. Functional luteolysis in response to hydrogen peroxide in human luteal cells. J Endocrinol 1995; 147:177-82.

5. 3° ESPERIMENTO: AZIONE DEGLI IMPIANTI DI MELATONINA SUI PARAMETRI RIPRODUTTIVI IN UN GRUPPO DI ARIETI CON BASSA QUALITÀ SPERMATICA

5.1 INTRODUZIONE

Sebbene nella specie ovina la stagionalità sia meno marcata nel maschio rispetto alla femmina, anche nell' ariete sono state descritte modificazioni del volume testicolare, nei profili ormonali, nel comportamento sessuale e nella qualità del seme, che possono influenzare le performance riproduttive. [1; 2]. Più in particolare, questa indolamina, per quanto riguarda i maschi, esplica due importanti funzioni: endocrina e potente molecola antiossidante.

Per quanto riguarda la funzione a livello endocrino in letteratura risulta ben documentata.

Nell' ariete la somministrazione di tale ormone durante il fotoperiodo crescente induce un incremento delle concentrazioni plasmatiche dell'FSH e dell'LH così come una riduzione dei livelli di prolattina nel sangue [3].

Sembra che la melatonina esplichi la sua attività anche a livello tiroideo. Nei becchi di razza Alpina e Saanen, è stato infatti evidenziato che la concentrazione plasmatica dell' ormone T3 (triiodotironina) segue i cambiamenti del fotoperiodo, aumentando durante il periodo lunghi diurno e decrescendo nel periodo brevi diurno [4]. Tali cicli stagionali degli ormoni tiroidei circolanti sono stati comparati con l'attività endocrina testicolare in un'ampia varietà di riproduttori stagionali [5]. Nei piccoli ruminanti (ovini e caprini) è stata inoltre evidenziata una correlazione negativa tra le concentrazioni plasmatiche di testosterone e quelle degli ormoni tiroidei [6;7].

In diverse specie selvatiche la melatonina esogena produce profondi cambiamenti a livello testicolare e durante la muta. In estate quando gli animali hanno normalmente testicoli quiescenti e presentano mantellazione estiva, il trattamento con melatonina induce un'iniziale recrudescenza testicolare e la muta autunnale, mentre la regressione testicolare e

la muta primaverile vengono ritardati dalla somministrazione di questo ormone durante l'inverno quando gli animali presentano attività testicolare e la mantellazione invernale [visone: 8; volpe blu: 9; volpe argentata: 10].

Nell'ariete è stato inoltre evidenziato come un incremento delle concentrazioni di melatonina inducano un aumento dei livelli di testosterone nel sangue (11;2;12]. 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 [13;14] o sull'ipofisi con incremento, in entrambi i casi, della secrezione dell'ormone luteinizzante[15;12;14]. Recettori per la melatonina sono infatti presenti nella zona dell'ipotalamo e dell'adenoipofisi [16;14].

Sono stati riscontrati, inoltre, recettori per questo ormone nelle cellule del Leydig indicando che la melatonina potrebbe avere anche un effetto diretto sul testicolo[17]. Così come sono stati rilevati dei recettori nell'epididimo di ratto [18] e nello spermatozoo umano [19] 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 [20]. 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[21]. Oltre a ciò, questo enzima risulta coinvolto nella capacitazione, nella reazione acrosomiale e nella decondensazione della cromatina durante la formazione del pronucleo maschile [22]. 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) [12].

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 [23] o inseminate durante

l'epoca non riproduttiva con seme proveniente da maschi con impianti di melatonina [24]. 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 [25]. Sulla base di quest'ultima affermazione andiamo a considerare la melatonina come potente molecola antiossidante e protettore contro le ingiurie riguardanti lo spermatozoo.

Lo stress ossidativo viene definito come uno squilibrio tra il sistema di difesa antiossidante della cellula e la produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS) [26]. L'abilità antiossidante di proteggere dai ROS il seme e il plasma seminale dei mammiferi è dato dal mantenimento dell'equilibrio tra la produzione di ROS e la loro neutralizzazione. Alcuni studi hanno posto in evidenza che ci sono variazioni stagionali nell'attività degli enzimi antiossidanti nel plasma seminale di ariete [27] che potrebbero in qualche modo andare a spiegare le variazioni stagionali nella fertilità dell'ariete[28]. Inoltre l'attività e l'espressione degli enzimi antiossidanti sembrerebbe essere modulata non soltanto dallo stato ossidativo delle cellule ma anche da altri fattori come la presenza di melatonina [29;30]. Come, in seguito dimostrato da Casao [25], dove la presenza di melatonina nel plasma seminale di ariete e la sua concentrazione sono fortemente correlati con l'attività di tre enzimi antiossidanti (glutatione reduttasi, superossido dismutasi e catalasi) quindi svolgendo un ruolo chiave nei sistemi di difesa.

Il congelamento del seme provoca, in quest'ultimo, un abbassamento della vitalità dovuto allo shock termico che ne deriva dalla riduzione della temperatura con uno sbilanciamento del rapporto antiossidanti e liberazione di ROS. Di conseguenza avremo danni a livello di diverse strutture come mitocondri [31], o a livello di plasma e membrana acrosomiale [32] andando quindi ad alterare l'integrità dello spermatozoo e perciò la sua capacità fecondante [33] o per ossidazione delle membrane dello stesso [34] o a livello di DNA nell'ariete [35] e nel seme di suino [36].

Per quanto riguarda la concentrazione di ATP intracellulare, nel lavoro di Berlinguer [37; 38] la presenza di melatonina riduce la deplezione di ATP nei processi di crioconservazione esercitando azione protettiva nei confronti dei mitocondri [39]. Questa sostanza aumenta e migliora l'attività del complesso I e IV del trasporto degli elettroni, quindi migliora la respirazione mitocondriale e la sintesi di ATP in condizioni normali e di stress [40]. Infatti nel seme la produzione di ATP supporta diverse attività cellulari ed eventi

biochimici che garantiscono il successo della fertilizzazione come la capacitazione, la reazione acrosomiale e la motilità [41]. La melatonina preserva, inoltre, l'integrità del DNA nello spermatozoo di ariete.

Scopo dell'esperimento e quello di stabilire l'effetto di carattere terapeutico determinato dall'impianto sottocutaneo della melatonina in un gruppo di arieti che manifestavano limitati parametri riproduttivi.

5.2 MATERIALI E METODI

Per il nostro esperimento sono stati usati un gruppo di nove arieti di razza sarda (Figura 1) allevati presso AGRIS (Agenzia della Regione Sardegna per la ricerca scientifica, la sperimentazionee 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.

Dai nove soggetti di razza sarda è stato prelevato il seme mediante l'utilizzo della vagina artificiale, in maniera da poterne valutare le caratteristiche del seme prima, e in seguito crioconservarlo. Subito dopo il prelievo dell'eiaculato, da ciascun ariete si rilevavano le dimensioni testicolari mediante l'uso di un calibro e si procedeva al prelievo ematico dalla giugulare in modo da dosare la concentrazione plasmatica di testosterone e prolattina. Tutte queste pratiche sono state ripetute per un anno intero con frequenza che variava in relazione al periodo: in epoca riproduttiva, si svolgevano due volte nello stesso mese, mentre in epoca non riproduttiva solo una volta per mese.

Una volta recuperato tutto il materiale si procedeva alla valutazione delle caratteristiche quantitative e qualitative del seme fresco.

Figura 1 Arieti di razza sarda

5.2.1 Valutazione della funzionalità spermatica

Gli eiaculati dei nove soggetti venivano sottoposti alla determinazione del volume con una micropipetta graduata. Immediatamente dopo il prelievo 90 µl del materiale seminale venivano destinati alla valutazione della concentrazione, della vitalità, della motilità e dei livelli di ATP mentre la restante parte del seme veniva sottoposta a congelamento.

Concentrazione spermatica

La concentrazione spermatica veniva calcolata mediante lo spettrofotometro con l' uso della luce visibile, dopo aver calcolato la curva standard specifica per l' ovino con una lunghezza d' onda di 540nm.

Vitalità spermatica

La vitalità spermatica veniva 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). Dieci microlitri 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 (figura 2).

1.3 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 (figura 3). Il sistema completo è costituito da un computer, un sistema ottico, una camera di conta nemaspermica, da un sistema cinematografico costituito da una videocamera, da un monitor per la visione digitalizzata dell'immagine e dal software per l'analisi dell'immagine. La telecamera trasmette l'immagine del campione posto nella camera di Makler (in grado di creare un solo piano focale) al monitor, questa viene quindi acquisita dal computer per essere digitalizzata e l'operatore, mediante modificazione dei toni di grigio, deve far corrispondere l'immagine reale alla traccia digitale.

Figura 2 Spermatozoi colorati con la colorazione vitale Eosina- Nigrosina. La colorazione bianca della testa indica la vitalità dello spermatozoo; la colorazione viola della testa rappresenta uno spermatozoo morto

Per effettuare l'analisi una aliquota di seme fresco veniva diluita per ottenere una concentrazione di 25 x 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. I parametri della motilità presi in esame sono:

- P motile (%) Motilità progressive
- Rapid (%) Motilità rapida

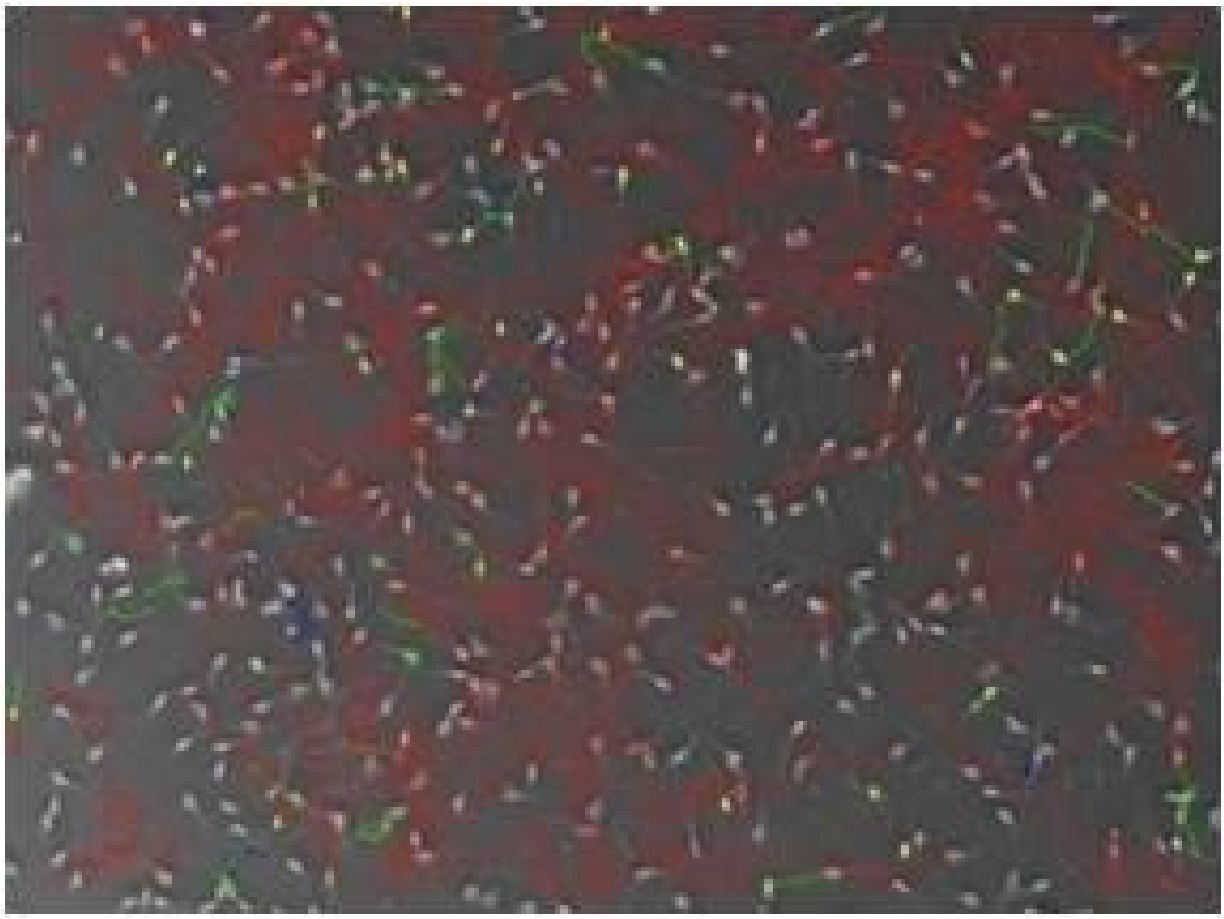


Figura 3 Esempio di immagine C.A.S.A.

Livelli di ATP

La misurazione dei livelli di ATP è stata effettuata tramite il metodo del dosaggio enzimatico descritto da Zinellu e coll. (2008). Cinquanta microlitri di seme vengono lavati per due volte con 0.1 ml di soluzione fisiologica fredda. Per l'estrazione dei nucleotidi, 0.1 ml di

acido perclorico ghiacciato (0.6 mol/L) vengono aggiunti a ciascuna eppendorf contenente gli spermatozoi e lasciati per 15 minuti; in seguito la sospensione viene centrifugata in una microcentrifuga per eppendorf (per 3 minuti a 10000 rpm) e il surnatante viene neutralizzato con 15 µl di 3.5 mol/L di K2CO3 (Balestri et al, 2007). Dopo una successiva centrifugazione in una microcentrifuga (3 minuti a 10000 rpm) il surnatante viene analizzato spettrofotometricamente con misurazione enzimatica e tramite CE. Per la misurazione dell'enzima i livelli di ATP sono stati misurati spettrofotometricamente a 340 nm usando la misurazione della coppia NADH legato all'enzima (Bergmeyer H.U., 1974) modificato per essere adattato al nostro sistema. La misurazione enzimatica viene effettuata a 37˚C con uno spettrofotometro Beckman DU-7, ed eseguito usando la coppia di enzimi, G6PD e HK. L'acido perclorico estratto (25µl) viene aggiunto a 400 µl di buffer TRAP (0.1 mol/L, pH 7.6). Alla mistura vengono inoltre aggiunti 2 µl di HK (2 mg/ml), 2 µl di G6PD (1 mg/ml), 8 µl di glucosio (18 mg/ml) e 8 µl di nicotinamide adenin dinucleotide fosfato (NADP+) (20 mg/ml). La quantità di ATP viene determinata dalla produzione di NADPH.

Dopo tutte queste analisi si procedeva al congelamento del seme.

5.2.2 Diluizione e congelamento del materiale seminale

L'estender base utilizzato in questo studio, per 100 ml, aveva la seguente composizione:

TRIS (g)	2.422
Acido citrico (g)	1.36
Fruttosio (g)	1.00
H2O MillyQ (ml)	67.2
Penicillina (UI)	100
Streptomicina (g)	0.1
Tuorlo d'uovo al 20%	

Il seme, diviso in 9 aliquote, veniva diluito con il mestruo classico sopra descritto, in

modo da ottenere una concentrazione di 800 x 10^6 spermatozoi/ml. La curva di refrigerazione prevedeva la discesa termica da 27° a 4° C nel tempo di circa 2 ore. A questo punto, si procedeva all'aggiunta dell'ultima parte di mestruo contenente il glicerolo, in modo da ottenere una concentrazione spermatica finale di 400 x 10^6 spermatozoi/ml ed una concentrazione finale di glicerolo del 4%. Dopo 20 minuti di equilibratura in glicerolo alla temperatura di 4° C, si provvedeva al congelamento in pellets utilizzando una base di CO_2 solida, che possiede una temperatura di -80° C, formando delle aliquote di 250 µl di seme che venivano poi immerse nell' azoto liquido.

Valutazione della funzionalità spermatica dopo scongelamento

Lo scongelamento veniva effettuato ponendo i pellets in una provetta in vetro sterilizzata immersa in un bagno termostatato a 39°C in continua agitazione per 20 sec. A questo punto il seme veniva utilizzato per le valutazioni successive.

Le stesse analisi effettuate al momento del prelievo venivano quindi ripetute dopo scongelamento dei pellets, in modo da poter comparare i dati ottenuti sul seme fresco con le diverse percentuali di vitalità, motilità e ATP ottenute. E' stato inoltre valutato il tasso di fertilizzazione del seme congelato nei due differenti gruppi, utilizzando oociti di pecora domestica di razza sarda.

5.2.3 TEST SVILUPPO IN VITRO

La raccolta degli oociti è stata effettuata da ovaie di ovini adulti (2-6 anni) regolarmente macellati. Immediatamente dopo il prelievo, le ovaie venivano poste in una soluzione salina tamponata (PBS, Sigma) addizionata di antibiotici (penicillina e streptomicina 5 mg/100 ml) e trasferite in laboratorio entro 1 ora dal prelievo. Il recupero degli oociti è avvenuto seguendo una tecnica già da tempo utilizzata nel nostro laboratorio; dopo essere state lavate per due volte in PBS le ovaie venivano dissezionate per l'isolamento dei follicoli. Tutte queste operazioni sono state eseguite a temperatura ambiente sotto una cappa a flusso laminare. Dai follicoli così dissezionati veniva liberato l'oocita mediante

rottura della parete follicolare con un ago di 18 gauge in una piastra petri contenente medium di dissezione costituito da TCM 199 contenente Hepes per stabilizzare il pH, antibiotici, e 0.1% di alcool polivinilico come macromolecola inerte. I complessi cumulo-oocita presenti nel medium venivano selezionati in relazione ad alcune caratteristiche morfologiche e strutturali. Sono stati infatti selezionati solo quelli provvisti di almeno 4 strati di cellule della granulosa, con citoplasma uniforme e omogenea distribuzione dei lipidi. Dopo essere stati lavati in medium di dissezione per 2 volte sono stati sottoposti a maturazione in vitro per il completamento della meiosi.

Le condizioni colturali per la maturazione in vitro degli oociti sono quelle impiegate nella gran parte dei laboratori che si occupano di biotecnologie riproduttive in vitro.

Il medium di coltura era costituito dal TCM 199 contenente il 10% di siero di pecora in estro, antibiotici, FSH e LH 10µL/ml, cisteamina 100µM e piruvato 8 mg/ml. Il sistema di maturazione era costituito da 0,5 ml di medium in una piastra four wells Nunc per colture cellulari ricoperto da paraffina liquida in cui erano coltivati per 24 ore da 25 a 40 complessi cumulo oocita a 39 °C in ambiente di massima umidità, con il 5% di CO_2 in aria atmosferica.

Dopo maturazione i complessi cumulo-oociti venivano parzialmente denudati dalle cellule della granulosa, divisi a random in 9 gruppi e fertilizzati in vitro. Il medium di fertilizzazione era composto da Sintethic Oviductal Fluid (SOF) supplementato con il 2% di siero di pecora in estro (v/v), 50 µg/ml di streptomicina e 50 IU/ml di penicillina (Tervit et al., 1972), eparina 10 mg/ml ed ipotaurina 1 mg/ml. Dopo scongelamento aliquote di seme provenienti dai 9 gruppi sperimentali venivano trasferite in tubi conici di vetro sterilizzati contenenti 1 ml di SOF e incubate per 15 minuti in condizioni standard. Gli spermatozoi mobili ottenuti mediante swim-up venivano diluiti in SOF equilibrato con una concentrazione finale di $1x10^6$ spermatozoi/ml e co-incubati in pozzetti ricoperti da olio minerale con una media di 30 oociti maturi per pozzetto in condizioni di massima umidità a 39°C, 5% di CO_2, 5% di O_2, e 90% di N_2. Dopo 24h i presunti zigoti venivano lavati e posti in coltura in four-well Petri contenente SOF + 0,4% di BSA (bovine serum albumin) supplementato con una miscela di aminoacidi essenziali e non essenziali a concentrazione oviduttale (Walker et al., 1996), ricoperti con olio minerale in condizioni atmosferiche di massima umidità con 5% di CO_2, 5% di O_2, 90% di N_2 e coltivati per 8 giorni sino al raggiungimento dello stadio di blastocisti.

Alla 22 e 32h post- fertilizzazione si andava a vedere il numero di oociti divisi in due

blastomeri. Dopo sei giorni coltura dalla fertilizzazione si andava a controllare se si erano formate delle blastocisti e si contavano per stabilire la cinetica dell' embrione.

5.2.4 IMPIANTO DI MELATONINA

Nel mese di marzo (epoca non riproduttiva) 5 arieti sono stati trattati con tre impianti (18mg l' uno) sottocutanei retro auricolari di melatonina a lento rilascio (Melovine, Ceva Salute Animale) mentre la rimanente parte (4 arieti) è stata usata come controllo senza subire alcun trattamento. Si è proceduto come descritto per gli altri mesi, ossia prelievo del seme, valutazione diametri testicolari, prelievo ematico. Così come analisi del seme fresco e in seguito allo scongelamento. Tutto ciò per andare a valutare se l' impianto della melatonina potesse contribuire in maniera positiva sulla qualità del seme degli arieti trattati. E' stato inoltre valutato il tasso di fertilizzazione del seme congelato nei due differenti gruppi, utilizzando oociti di pecora domestica di razza sarda.

5.2.5 Determinazione della capacità antiossidante totale nel plasma

I campioni di sangue prelevati in tubi vacutainer contenenti LITIO EPARINA come anticoagulante, venivano centrifugati a 1500 g per 10 min e il plasma recuperato, conservato a -80°C sino al dosaggio.

La capacità antiossidante totale nel plasma è stata determinata usando il metodo descritto precedentemente. In breve, una soluzione di ABTS·+ è stata preparata sciogliendo 19,5 mg di 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS; Sigma, Deisenhofen, Germany) e 3,3 mg di potassio per solfato (Dipotassium peroxodisulphate; Sigma) in 7 ml di tampone fosfato 0,1M, pH 7,4. Questa soluzione è stata conservata al buio per 12 ore e poco prima del dosaggio diluita (approssimativamente 1:80) in tampone fosfato 0,1 M, pH 7,4, sino ad ottenere un'assorbanza di circa 1,0 alla lunghezza d'onda di 734 nm. Il campione è stato diluito 1:50 in tampone fosfato 0,1M pH 7,4 e l'assorbanza è stata misurata in doppio in uno spettrofotometro Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer a

734 nm, 5 minuti dopo aver aggiunto il campione alla soluzione di ABTS·+. Il decremento dell'assorbanza dell'ABTS·+ in presenza del campione è proporzionale alla capacità antiossidante del campione stesso ed è stata espressa come capacità antiossidante trolox equivalente (Trolox Equivalent Anti-Oxidant Capacity (TEAC) e cioè concentrazione di trolox che produce lo stesso effetto antiossidante del campione studiato. Il calcolo è stato eseguito sulla base di una curva standard di soluzione di trolox 5, 10, 15 20 µM.

5.2.6 Dosaggio ELISA testosterone e prolattina

I prelievi di sangue degli agli arieti sono stati eseguiti usando provette sotto vuoto contenenti litio-eparina come anticoagulante (Vacutainer Systems Europe, Becton Dickinson, Meylan Cedex, France). Subito il campione di sangue veniva centrifugato a 1500 g per 10 min e il plasma ottenuto è stato stoccato a -20°C in aliquote da 1ml sino al momento del dosaggio degli ormoni testosterone e prolattina.

I livelli di testosterone sono stati dosati in duplicato usando un Kit commerciale ELISA (DRG Instruments GmbH, D-35039 Marburg, Germany), basato sul principio competitivo.

I pozzetti della micro piastra da 96 sono cottati con anticorpi policlonali diretti contro il sito antigenico del testosterone. In ogni pozzetto veniva aggiunto il campione, contenente il testosterone endogeno, o lo standard e il testosterone coniugato alla perossidasi di rafano. Nel pozzetto iniziava così la competizione per il sito di legame con l'anticorpo antiprogesterone cottato al pozzetto e dopo una incubazione di un'ora, i pozzetti venivano lavati per eliminare tutto ciò che non era legato.

La quantità di testosterone coniugato legato all'anticorpo cottato, veniva visualizzata con l'aggiunta della soluzione di substato (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB), che dopo una incubazione di 15 minuti, portava allo sviluppo del colore blu. La reazione con il substrato veniva stoppata con l'aggiunta di acido solforico (stop solution). L'intensità del colore giallo così ottenuto veniva misurata spettrofotometricamente a 450 nm ed era inversamente proporzionale alla concentrazione del testosterone nel campione.

I livelli di prolattina sono stati dosati in duplicato usando un Kit commerciale ELISA (DRG Instruments GmbH, D-35039 Marburg, Germany), basato sul principio non competitivo a sandwich.

I pozzetti della micro piastra da 96 sono cottati con anticorpi policlonali diretti contro il sito antigenico della prolattina. In ogni pozzetto veniva aggiunto il campione, contenente la prolattina endogena, o lo standard e un anticorpo anti-prolattina monoclonale coniugato alla perossidasi di rafano. Dopo una incubazione di una mezz'ora, i pozzetti venivano lavati per eliminare tutto ciò che non era legato.

La quantità di perossidasi legata era proporzionale alla concentrazione di prolattina nel campione e veniva visualizzata con l'aggiunta della soluzione di substato (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB), che dopo una incubazione di 15 minuti, portava allo sviluppo del colore blu. La reazione con il substrato veniva stoppata con l'aggiunta di acido solforico (stop solution). L'intensità del colore giallo così ottenuto veniva misurata spettrofotometricamente a 450 nm ed era direttamente proporzionale alla concentrazione della prolattina nel campione.

Tutti i reagenti dei kit, controlli, standard e campioni stoccati sono stati analizzati dopo essere stati portati a temperatura ambiente (25°C) mezz'ora prima di iniziare il dosaggio.

Tutti i dosaggi sono stati eseguiti utilizzando il Personal Lab Adaltis (Adaltis srl, 00012 Rome, Italy), uno strumento che procede in maniera automatica per i protocolli ELISA.

La sensitività analitica del test era di 0,083 ng/mL per il testosterone e di 0,35 ng/ml.

5.3 ANALISI STATISTICA

L' analisi statistica è stata effettuata mediante il software Statgraphic Centurion XV (versione 15.2.06 per Windows; StatPoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA). Le differenze nei vari parametri spermatici presi in considerazione nei 9 arieti sia nel seme fresco che in quello congelato sono stati analizzati mediante analisi ANOVA. Sono stati considerati significativi valori di $p \leq 0,05$.

5.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Quantunque gli aspetti riproduttivi risultino maggiormente evidenti nelle femmine (periodi di totale assenza di cicli sessuali) rispetto a quanto osservato nei maschi (spermatogenesi ed attività sessuale ininterrotta), la stagione primaverile con l'espressione dei giorni lunghi determina una riduzione della capacità riproduttiva anche negli individui di sesso maschile (42). Il trattamento a base di impianti di melatonina può migliorare questi parametri e fornire una qualità del materiale seminale utilizzabile nella pratica di inseminazione strumentale anche nella stagione non riproduttiva permettendo di accrescere il livello di discendenza di arieti geneticamente selezionati nei centri di inseminazione strumentale (12).

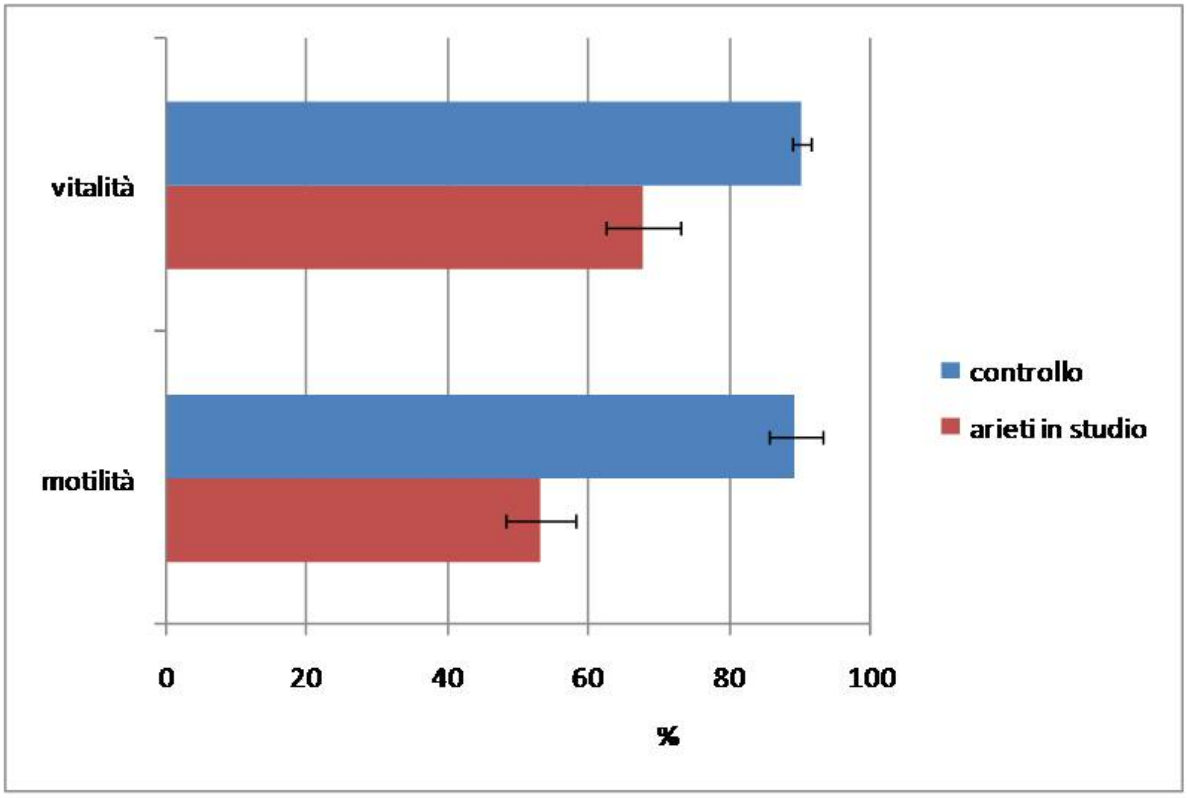
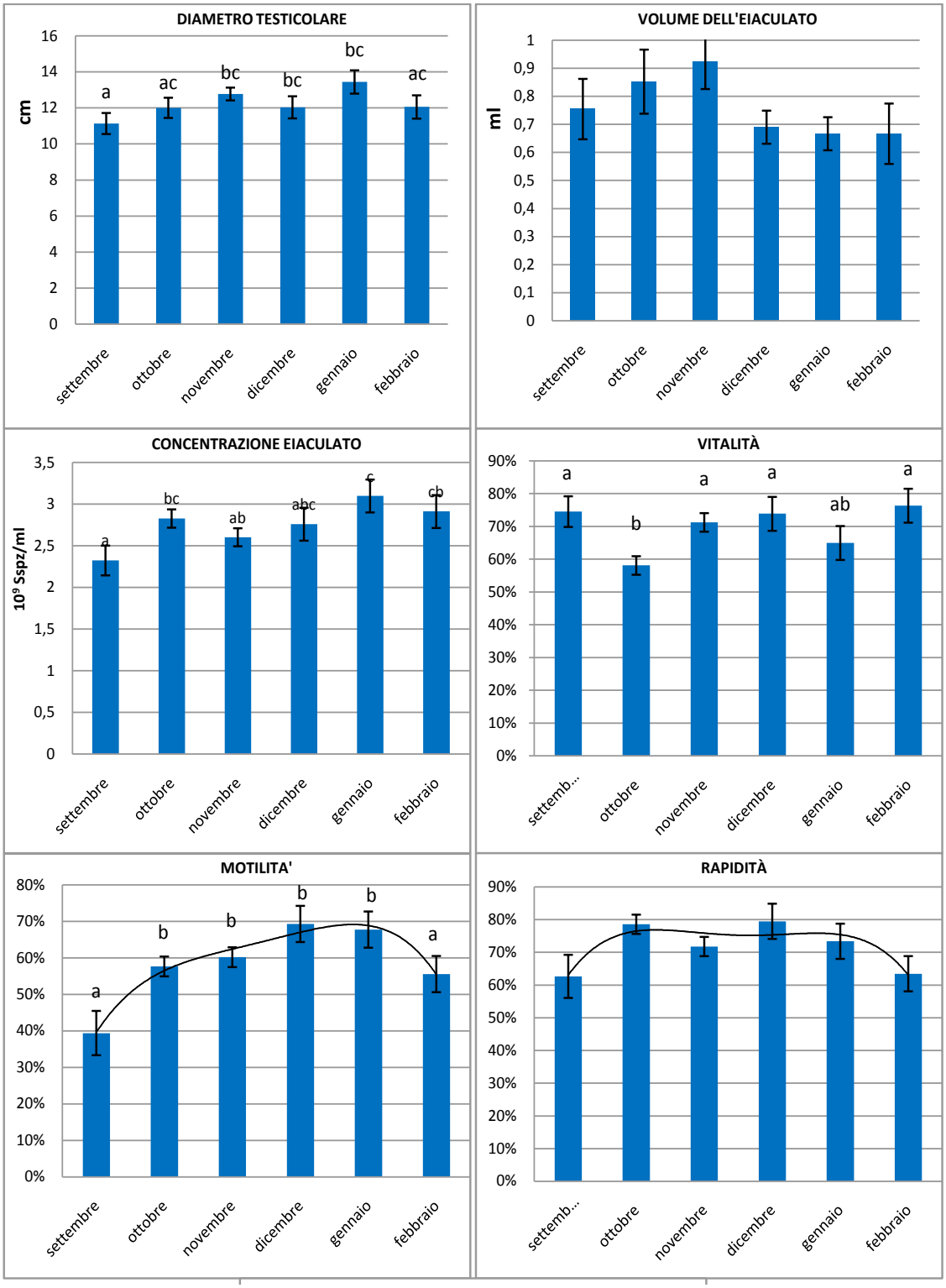


Grafico n.1 Confronto fra i livelli di vitalità e motilità degli arieti sottoposti a sperimentazione con i livelli standard del nostro laboratorio

Come si evince dal grafico n. 1, al prelievo del materiale seminale, gli arieti oggetto del nostro studio presentavano valori di motilità intorno al 50% e di vitalità intorno al

Panello 1. Andamento da settembre a febbraio di alcuni parametri del materiale seminale raccolto mediante vagina artificiale



70%, che vengono considerati per il nostro laboratorio (valori intono al 90%) decisamente non consigliabili per un successivo utilizzo sia per la crioconservazione che per la fertilizzazione sia in vivo che in vitro.

Questo aspetto risulta di maggiore importanza in quanto gli arieti erano oggetto di selezione all'interno di un centro di IA.Come si evince dal primo grafico del panello 1 l'andamento del parametri di quantità come volume dell'eiaculato, diametro scrotale e concentrazione degli spermatozoi appaiono non in linea fra loro. In particolare volume dell'eiaculato manifesta una tendenza dei valori alla crescita da settembre a novembre mentre si mantengono alquanto più bassi da dicembre a febbraio. Fra i valori non abbiamo rilevato alcuna significatività. Diverso invece è stato l'andamento del diametro testicolare che ha registrato un incremento significativo da settembre a novembre, tuttavia i valori elevati si mantengono anche nel mese di gennaio considerata già come stagione non riproduttiva. La concentrazione degli spermatozoi nell'eiaculato riflette in parte l'andamento del diametro testicolare, cresce significativamente ad ottobre ma questa crescita significativa si mantiene anche per il mese di gennaio. Per quanto riguarda invece i parametri di qualità del materiale seminale, la vitalità degli spermatozoi decresce significativamente ad ottobre e riprende ad essere significativamente alta a novembre e dicembre perdurando fino a febbraio. La rapidità degli spermatozoi mostra una tendenza all'incremento ma ciò non è risultata staticamente significativa. Anche la motilità progressiva degli spermatozoi appare sovrapporsi all'andamento della rapidità con tendenza a crescere da ottobre fino a gennaio.

Come si evince dal grafico n.2 il livello dell'ATP subisce un incremento da settembre fino gennaio ma le differenze non sono risultate staticamente significative. Tutti questi parametri risultano inferiori a quanto riportato in letteratura circa l'influenza del fotoperiodo sulla qualità del materiale seminale (43-45. 12, 42) e confermano l'impostazione di questa prova sperimentale circa i parametri di quantità e qualità del materiale seminale di questi arieti presenti nel centro di IA. Come accennato in precedenza il nostro scopo era di verificare se la somministrazione di melatonina potesse risultare efficace come attività di tipo terapeutico a migliorare i parametri endocrini ed esocrini degli arieti del centro di IA.

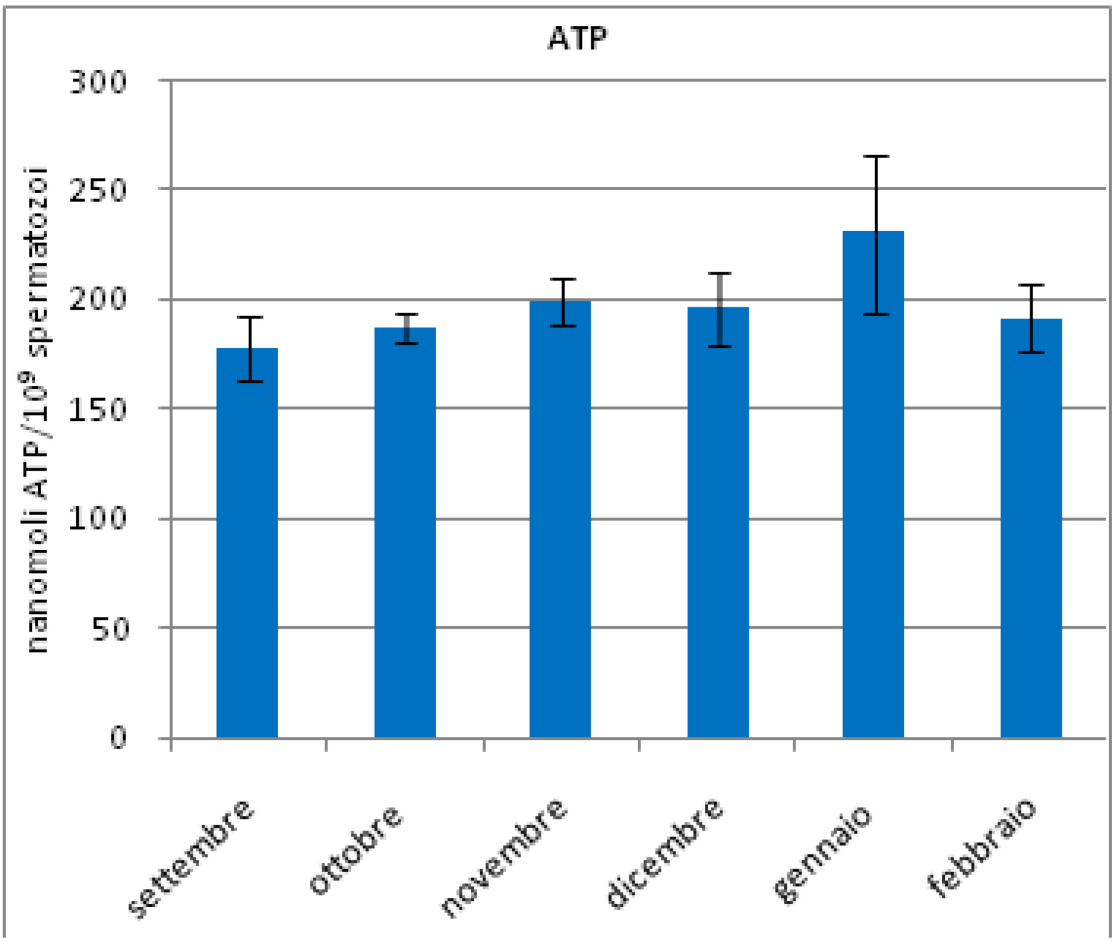
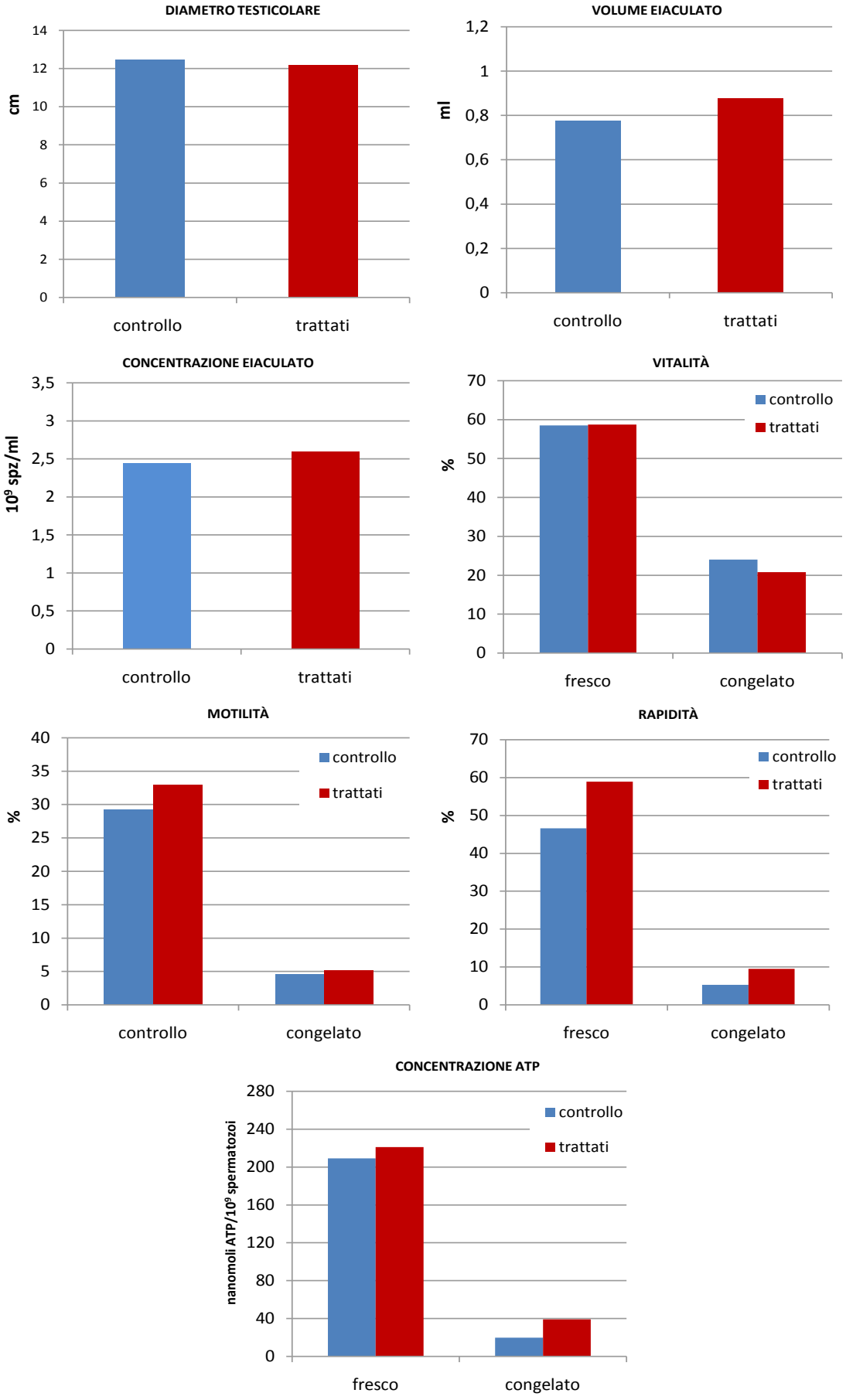


Grafico n.2 Andamento da settembre a febbraio del livello di ATP negli spermatozoi presenti nel materiale seminale raccolto dagli arieti.

L'impianto commerciale, che consiste di un elastomero contenente in genere 18 mg dell'ormone pineale è stato posizionato sottocute alla base dell'orecchio. Il preparato ormonale permette la liberazione della melatonina e di mantenere valori in circolo abbastanza elevati dopo circa 40 giorni e fino ai 60 giorni dal momento dell'impianto (46), tuttavia Zuniga et al. (47) ha registrato che la liberazione dell'ormone permette di avere livelli di melatonina accettabili fino ad oltre i 100 giorni. Le vari e fasi di sperimentazione sono state effettuate seguendo diversi indirizzi che hanno riguardato alcune delle molteplici azioni che la melatonina svolge nell'organismo, in particolare: l'aspetto squisitamente endocrino, i prodotti dell'attività gonadale come le caratteristiche del materiale seminale, la potenziale capacità fecondante degli spermatozoi, la produzione di molecole con l'attività antiossidativa. E' stata inoltre portata avanti una prova relativa all'influenza dell'impianto di

melatonina sulla crioconservabilità del materiale seminale.


DIAMETRO TESTICOLARE
cm
14
12
10
8
6
4
2
0
controllo
trattati
VOLUME EIACULATO
ml
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
controllo
trattati
CONCENTRAZIONE EIACULATO
10⁹ spz/ml
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
controllo
trattati
VITALITÀ
%
70
60
50
40
30
20
10
0
controllo
trattati
fresco
congelato
MOTILITÀ
%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
controllo
trattati
controllo
congelato
RAPIDITÀ
%
70
60
50
40
30
20
10
0
controllo
trattati
fresco
congelato
CONCENTRAZIONE ATP
nanomoli ATP/10⁹ spermatozoi
280
240
200
160
120
80
40
0
controllo
trattati
fresco
congelato

Nel pannello 2 sono contenuti i risultati relativi all'effetto del trattamento dell'impianto di 18 mg di melatonina in stagione non riproduttiva sui parameri analizzati nella precedenza nella stagione riproduttiva. Accanto come detto in precedenza risultano presenti anche i dati relativi alla effetto della melatonina sulla crioconservabilità degli spermatozoi in entrambi i gruppi trattati con melatonina e controllo. I valori rappresentano una media relativa ai mesi di marzo (inizio del trattamento, aprile e maggio dei gruppi sottoposti a trattamento confrontati con quelli controllo. Il primo istogramma mette in evidenza come la melatonina accresce le percentuali di motilità negli spermatozoi ma questo incremento non è risultato significativo. Per quanto riguarda questo parametro invece come si evince dall'istogramma la motilità si riduce notevolmente in seguito al congelamento e fra i due gruppi non ci sono differenze. Nell'istogramma che rappresenta la vitalità spermatica, il livello dell'ATP, la rapidità spermatica non si sono registrate differenze fra i due gruppi sia per quanto riguarda i valori del materiale seminale fresco che congelato. Altrettanto possiamo sostenere per il volume e la concentrazione degli spermatozoi non si sono evidenziate differenze degne di rilievo. In pratica l'impianto di melatonina nei nostri arieti non è stato in grado di implementare i valori qualitativi e quantitativi del materiale seminale raccolto.

Se scorriamo i dati in letteratura ci accorgiamo che i risultati sono stati non sempre sovrapponibili fra i vari Autori ed in alcuni casi si sono registrate differenze abbastanza importanti. Ciò è naturalmente da imputare alla diversità di razze, della latitudine, del periodo dell'anno, del management aziendale, della quantità di ormone somministrato. Faigl et al. (48), utilizzando un gruppo di arieti Awassi di un centro di IA, hanno osservato che il trattamento con 54 mg a lento rilascio dell'ormone pineale, effettuato a fine febbraio ed in ragione di 54 mg, è in grado di incrementare il livello del testosterone in circolo ma non provoca alcun miglioramento nelle caratteristiche del materiale seminale raccolto sia in termini di volume, di concentrazione e di motilità delle cellule spermatiche. Allo stesso modo Palacin et al. (23) hanno trattato 3 differenti razze di arieti (Manchega, Aragonese e Assaf) con impianti di melatonina di 18 mg ed hanno evidenziato che il diametro scrotale aumenta significativamente rispetto al gruppo di arieti controllo solo per le razze Manchega ed Assaf ma non per la razza Aragonese. Curiosamente lo stesso gruppo di lavoro invece lavorando su arieti di razza Aragonese nel periodo di tempo compreso fra marzo e giugno hanno

riscontrato che, dopo 46-75 giorni dal posizionamento di un impianto sottocutaneo di 18 mg di melatonina, l'ormone incrementa significativamente la motilità progressiva degli spermatozoi (24). Risultati positivi sono stati ottenuti da Fitzgerald e Stellflug (49) lavorando con impianti di melatonina su arieti di razza Polypay e Booroola in stagione non riproduttiva. Gli Autori hanno riscontrato un incremento del livello di melatonina in circolo rispetto agli animali non trattati, hanno registrato un incremento del diametro scrotale, del livello di testosterone ed una percentuale di fertilità simile a quella della stagione riproduttiva. Gli Autori concludono il loro lavoro affermando che l'impianto di melatonina è in grado di ripristinare l'efficienza riproduttiva dei maschi in stagione non riproduttiva. Rosa et al. (28), sperimentando l'effetto della melatonina in non-stagione riproduttiva su due differenti razze ovine Charollais e Texel, non hanno riscontrato alcun miglioramento in termini di diametro e volume testicolare nè del volume e della concentrazione degli spermatozoi nel materiale seminale raccolto. Gli Autori giustificano il mancato effetto positivo dell'impianto di melatonina negli arieti per il fatto che per poter agire l'ormone pineale è necessario esporre gli animali ad una fase di sensibilizzazione caratterizzata da giorni lunghi per un periodo di 45-60 giorni. Appare chiaro che la funzionalità dell'impianto preceduto dal "priming" di giorni lunghi potrebbe non rendere necessario il trattamento per il fatto che si sta naturalmente passando dai giorni lunghi nella fase dei giorni corti. Più di recente Egerszegi et al. (50), hanno registrato un incremento significativo del diametro testicolare, del volume dell'eiaculato e della motilità spermatica negli animali trattati con melatonina. Gli stessi autori hanno inoltre riscontrato un incremento del livello basale del testosterone ematico nei soggetti trattati con l'ormone pineale. Il trattamento con impianti di melatonina su arieti di razza Black Racka in non-stagione riproduttiva tuttavia è stato differente rispetto al nostro protocollo in quanto ad un primo impianto di 18 mg a fatto seguito 30 giorni dopo ad un ulteriore impianto. I risultati staticamente significativi sono stati ottenuti in seguito al secondo impianto. Al contrario, Sookhtehzari, et a. (51), lavorando su razza Shall in stagione non riproduttiva, hanno potuto riscontrare che l'impianto di melatonina non è in grado di incrementare il diametro scrotale ne di migliorare i parametri dell'eiaculato. Come si evince dal pannello tutti i parametri del seme del gruppo trattato con melatonina che controllo sono risultati pressoché simili. Kaya et al. (52), hanno verificato che gli impianti di melatonina effettuati in stagione e non stagione riproduttiva determinano un incremento della crioconservabilità del materiale seminale raccolto da arieti di razza Konia, in particolare

è stato osservato che in stagione non riproduttiva la melatonina è in grado mantenere in modo significativamente maggiore l'integrità del cappuccio acrosomiale.

Nella nostra prova abbiano inoltre verificato se l'impianto di melatonina modifica la composizione delle molecole antiossidanti nel sangue. Come si evince dal grafico i valori del trolox sono risultati sovrapponibili fra plasma di soggetti trattati e controllo. Eppure la melatonina svolge un ruolo fondamentale come molecole antiossidante antogonizzando gli effetti deleteri dei ROS come risulta dall'effetto sulla vitalità degli embrioni dopo vitrificazione. E' verosimile che l'influenza della melatonina si esplica solo a livello del liquido seminale e la sua influenza sul plasma sanguigno risulta assai complessa. In proposito Casao et al. (53) hanno riscontrato che il trattamento di melatonina in stagione non-riproduttiva negli arieti di Razza Aragonese ha provocato nel plasma seminale un significativo incremento del livello basale del testosterone e dell'estradiolo, allo stesso tempo l'impianto dell'ormone pineale ha determinato un significativo incremento del glutatione perossidasi e glutatione redutasi ma non della catalasi e della superossido dismutasi. Appare importante che gli autori segnalino questo effetto positivo della melatonina sulla concentrazione delle molecole ad attività antiossidativa, glutatione reduttasi e glutatione perossidasi nel plasma seminale. Sebbene in un lavoro precedente Casao et al. (24) avevano osservato correlazione fra livello di melatonina e la concentrazione del glutatione redutasi, della catalasi e della superossido dismutasi ma non del glutatione perossidasi. Il ruolo di queste molecole appare determinate per evitare la perossidazione dei lipidi di membrana che porterebbero rapidamente lo spermatozoo all'incapacità di fecondare la cellula uovo. E' noto tuttavia che il gamete maschile necessita anche di piccoli quantitativi di ROS per poter procedere alla rottura dell'acrosoma e liberare il suo contenuto per cui l'ambiente ideale di un gamete maschile consiste in una sorta di equilibrio fra molecole riducenti quali il glutatione, le catalasi, la SOD ed i ROS.

Grafico 7. Concentrazione di trolox nel plasma sanguigno degli arieti trattati con melatonina e in quelli controllo nell' epoca non riproduttiva (marzo, aprile e maggio).

Da quanto detto in precedenza ci si aspettava come conclusione finale che l'impianto di melatonina effettuato in non-stagione riproduttiva non migliora la quantità e qualità dei parametri dell'eiaculato. Tuttavia allorchè abbiamo messo a confronto la potenziale capacità fecondante in vitro degli spermatozoi di entrambi i gruppi abbiamo evidenziato un dato molto interessante. Come si evince dal grafico n… gli spermatozoi provenienti dagli arieti trattati con melatonina produce, dopo fertilizzazione, percentuali di divisioni della cellula uovo in numero maggiore rispetto ai non trattati. La successiva coltura in vitro degli embrioni divisi fino allo stadio di blastocisti ha permesso di evidenziare che gli spermatozoi derivanti dagli arieti trattati con melatonina sono capaci di produrre un numero di blastocisti staticamente maggiore rispetto agli spermatozoi degli arieti non trattati. Il trattamento con melatonina è stato in grado di elevare le percentuali di blastocisti prodotte al livello standard

del nostro laboratorio impiegato come controllo interno.

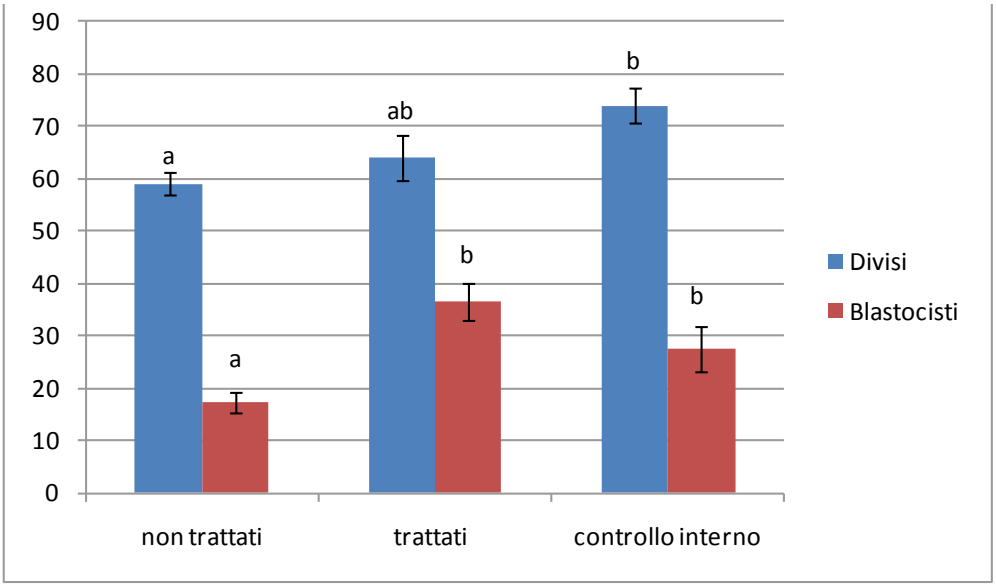


Grafico 8. Percentuali di cleavage e blastocisti ottenutedopo fertilizzazione in vitro con spermatozoi prelevati da arieti trattati con melatonina e crioconservati durante la stagione non riproduttiva (controllo interno di laboratorio con spermatozoi di ariete crioconservato di qualità controllata; Test Chi quadro: a vs b= $p<0,05$) .

Il risultato appare di rilievo poiché allo stato attuale la valutazione del parametro ideale per predire la capacità fecondante di un eiaculato appare molto difficile da indicare. In letteratura sono presenti diversi lavori che indicano questo o quel parametro ma che vengono smentiti successivamente da altri lavori. Per quanto riguarda l'effetto della melatonina sulla capacità fecondante i lavori in letteratura risultano abbastanza pochi. Casao et al. (25, 43), lavorando su arieti di razza Aragonese nel periodo di tempo compreso fra marzo e giugno hanno riscontrato che gli spermatozoi, dopo 46-75 giorni dal posizionamento di un impianto sottocutaneo di 18 mg di melatonina, esprimevano percentuali di zona binding sulla zona pellucida di ovociti immaturi significativamente più elevati rispetto agli spermatozoi derivanti da arieti non trattati. Gli stessi Autori non hanno ottenuto percentuali di gravidanza staticamente significative utilizzando gli spermatozoi degli animali trattati con

melatonina. Naturalmente il risultato di zona binding raggiunto dai colleghi spagnoli appare molto parziale, mentre la produzione di embrioni allo stadio di blastocisti risulta di particolare efficacia. Lo stadio di blastocisti è quello che maggiormente si presta al trasferimento su soggetti riceventi e quello che maggiormente si presta alla crioconservazione, insomma uno stadio di sviluppo embrionale ideale per tutte le manipolazioni. Alla luce di quanto appena detto il nostro risultato appare di indubbio valore e non abbiamo riscontrato in letteratura alcun lavoro sulla produzione di blastocisti da spermatozoi derivanti da arieti trattati con melatonina.

Naturalmente l'influenza del trattamento con melatonina sulla attività endocrina risulta di più semplice ed oggettiva valutazione rispetto all'influenza sulla attività esocrina dell'ormone pineale in quanto spesso la produzione, il recupero e la valutazione del materiale seminale risultano di più difficile verifica.

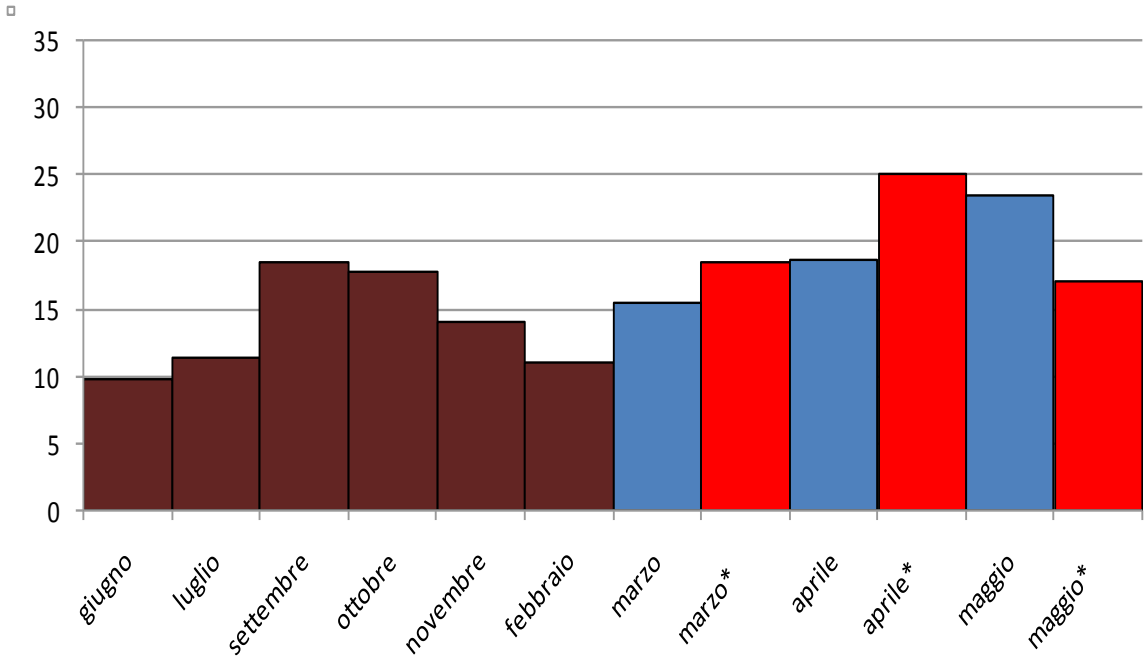


Grafico 9. Andamento annuale del testosterone.Con l'asterisco sono indicati gli animali trattati con impianto di melatonina vicino a campioni non trattati (giugno luglio settembre ottobre novembre tutti gli arieti)

Come si evince dal grafico n 9 il livello del testosterone negli arieti risulta staticamente più elevato nei mesi di settembre ed ottobre e sono in linea con un precedente lavoro svolto dal prof. Manunta et al. (1981) sugli arieti di razza Sarda. Da ciò appare chiaro che anche la nostra razza ovina non si discosta da quelli che sono i livelli del testosterone nel corso dell'anno. Anche in quel lavoro il livello dell'ormone testicolare risultava elevato già a settembre e tendeva a calare decisamente a novembre e soprattutto a dicembre. Questo risultato appare in linea con la latitudine della sperimentazione dell'area Mediterranea (40° Nord), quindi area temperata per cui l'influenza del fotoperiodo è meno marcata rispetto all'area più a nord. In seguito all'impianto di melatonina al 1 di marzo si registra un lieve incremento dell'ormone che, sebbene non significativo, viene confermato anche nel mese di aprile cioè 30-60 giorni dall'inizio del trattamento. Possiamo considerare l'effetto certamente effimero rispetto a quanto si osserva in letteratura in quanto l'incremento del testosterone non è stato significativo e già nel mese successivo di maggio sono i controllo a manifestare un livello dell'ormone più elevato. Chemineau et al. (1992) hanno osservato che il trattamento con melatonina su arieti Ile de France presenti in un centro di I.A. determinava una stimolazione a livello ipotalamico in grado di incrementare i liveli delle gonadotropine ipofisarie FSH ed LH e conseguentemente del livello basale del testosterone. Gli Autori evidenziavano inoltre che la melatonina era in grado di incrementare del 40% la produzione di spermatozoi garantendo di aumentare del 100% le dosi da utilizzare nella inseminazione strumentale. La maggiore espressività dell'effetto ariete è mediato dai feromoni che sono modulati dall'azione e dal livello del testosterone nel corso dell'anno (Ortavant et al.1985), pertanto il trattamento con la melatonina potrebbe modificare il livello del testosterone e determinare un incremento della produzione di feromoni indispensabili per la stimolazione delle femmine. Partendo da questa considerazione (Rosa et al.2000) hanno trattato degli arieti di razza Texel e Charollais con melatonina. Il trattamento a base di melatonina ha incrementato il livello circolatorio del testosterone da 4.30 ng/ml fino a 10.1 ng/ml provocando una maggiore espressività dell'effetto ariete. Gli arieti introdotti in un gregge di pecore hanno determinato una ripresa dell'attività riproduttiva e una sincronizzazione dell'estro nelle femmine in stagione non riproduttiva ed allo stesso tempo hanno provocato una maggiore espressività del comportamento estrale che è culminato con una più alta efficienza riproduttiva delle pecore. Kokolis et al. (2000) lavorando su arieti di razza Chios, ha evidenziato che l'impianto di melatonina effettuato in stagione e in non-stagione

riproduttiva, determinava un incremento del livello basale del testosterone nel circolo ematico e dell'attività della acrosina negli spermatozoi raccolti mediante vagina artificiale. Il livello dell'acrosina è risultato maggiore nella stagione riproduttiva. Questo dato riportato dagli Autori non ci sembra proprio un effetto positivo della melatonina sugli spermatozoi. Se il livello dell'acrosina subisce un incremento vuole significare che il cappuccio acrosomiale risulta danneggiato con la liberazione del suo contenuto. In tal caso lo spermatozoo sarà incapace di legarsi alla zona pellucida della cellula uovo inficiandone la successiva capacità fecondante.

La differenza riscontrata rispetto ai lavori citati in precedenza potrebbe essere imputabile al nostro protocollo sperimentale che ha previsto solo un impianto di 18 mg di melatonina rispetto ad altri lavori dove la somministrazione era di gran lunga maggiore 54 mg (48) ed inoltre al primo impianto faceva seguito un secondo impianto (50).

La prolattina riflette il ciclo andamento annuale legato alla durata della luce in posizione opposta a quella del testosterone. Come si evince dal grafico n 10 il livello dell'ormone decresce significativamente da giugno a novembre. Successivamente tende ad incrementare già nel mese di febbraio in relazione all'aumentare delle ore di luce, e questa tendenza si mantiene anche nei mesi successivi rispetto invece all'andamento dei soggetti trattati con la melatonina che mostrano valori decisamente più bassi. Ciò è in linea con quanto presente in letteratura. Lincol e Clarke (54), lavorando su pecore Soay, hanno riportato che il trattamento con l'ormone pineale determina una stimolazione dell'attività ipofisaria provocando una limitazione della liberazione della prolattina riducendone il livello circolatorio dell'ormone ed a livello ipotalamico stimolando la liberazione delle gonadotropine capaci di riprendere l'attività delle gonadi. La non significatività dei nostri dati potrebbe essere determinata da quanto accennato in precedenza per il testosterone relativa al basso dosaggio ed al fatto che l'impianto commerciale assicura il maggiore effetto fra i 30 ed i 60 giorni dall'inizio del trattamento. Inoltre la mancata significatività per questo parametro potrebbe essere data anche l'alta variabilità dei risultati presenti fra i soggetti.

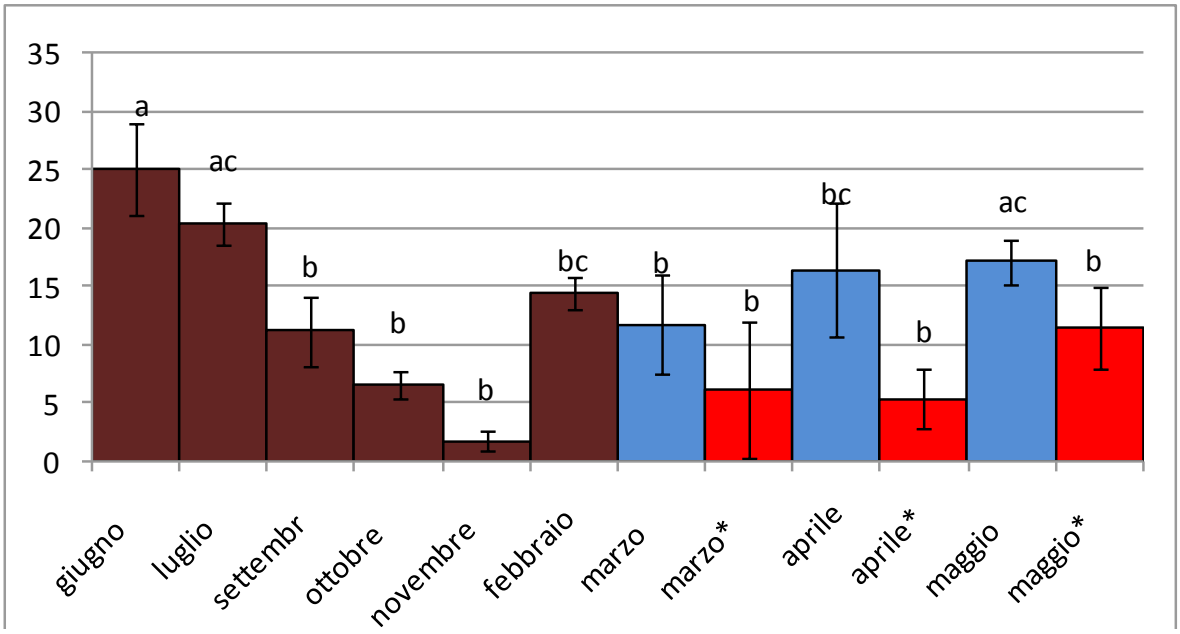


Grafico 10. Andamento annuale della prolattina. Con l'asterisco sono indicati gli animali trattati con impianto di melatonina vicino a campioni non trattati (giugno luglio settembre ottobre novembre tutti gli arieti).

5.5 CONCLUSIONI

Anche in questo terzo esperimento la melatonina ci ha confermato la sua influenza positiva sui parametri riproduttivi degli arieti ma la sua azione appare molto complessa in relazione alle molteplici attività dirette ed indirette che esercita a livello endocrino generale e locale sulle gonadi Come accennato in precedenza in letteratura sono presenti diversi lavori che descrivo l'effetto della melatonina sulla riproduzione prendono in esame a volte un solo parametro. E' sorprendente che in una prova sperimentale dove si vuole verificare l'effetto della melatonina sul materiale seminale si valuti solo la concentrazione o la motilità e non si prendano in considerazione tutti gli altri parametri. Allo stesso modo sono

necessarie nuove prove sperimentali per verificare eventuali interrelazioni fra livelli endocrini e parametri quantitativi e qualitativi del materiale seminale nonché il suo effetto anti ROS. I risultato da noi conseguito che il trattamento a base di melatonina è in grado di incrementare il potere fecondante degli spermatozoi in arieti con limitate capacità riproduttive necessita naturalmente di una ulteriore conferma. Tuttavia questo nostro risultato appare di grande importanza in quanto in letteratura risultano alquanto scarse le prove di fertilizzazione e di produzione embrionale.

5.6 BIBLIOGRAFIA

1. Cardozo JA, Fernàndez-Juan M,Forcada F et al.(2006) Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis Theriogenology 66,841-850

2. 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

3. Sanford LM, Beaton DB, Howland BE, Palmer WM (1978) Photoperiod-induced changes in LH, FSH, Prolactin and Testosterone secretion in ram Can. J. Anim. Sci. 58, 123-128

4. Todini L, Delgadillo JA, Debenedetti A, Chemineau P. 2006. Plasma total T3 and T4 concentrations in bucks as affected by photoperiod. Small Rumin Res 65, 8-13.

5. Karsch FJ, Dahl GE, Hachigian TM, Thrun LA. 1995. Involvement of thyroid hormones in seasonal reproduction. J Reprod Fertil Suppl 49: 409-422.

6. Todini L, Lucaroni A, Malfatti A, Debenedetti A, Costarelli S. 1992. Andamento ormonale della concentrazione ematica degli ormoni tiroidei nella capra. Differenze tra maschi e femmine (male-female deifferences in the annual profiles of the thyroid hormones blood level by yhe goat). Atti Soc Ital Sci Vet 46: 169-173.

7. Taha TA, Abdel-Gawad EI, Ayoub MA. 2000. Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions. Semen characteristic and hormonal levels. Anim Sci 71:317-324.

8. Rose J, Stormshark F, Oldfield J, Adair J. 1985. The effects of photoperiod and melatonin on serum prolactin levels of mink during the autumn molt. Journal of Pineal Research 2: 13-19.

9. Smith AJ, Mondain-Monval M, Andersen Berg K, Simon P, Forsberg M, Clausen OPF, Hansen T, Moller OM, Sholler R. 1987. Effects of melatonin implantation on spaermatogenesis, the moulting cycle and plasma concentrations of melatonin, LH, prolactin and testosterone in the male blue fox (Alopex lagopus). Journal of Reproduction and Fertility 79: 379-390.

10. Forsberg M, Madej A. 1990. Effects of melatonin implants on plasma concentrations of testosterone, thyroxine and prolactin in the male silver fox (Vulpes vulpes). Journal of Reproduction and Fertility 89: 351-358.

11. Kennaway DJ, Gilmore TA. 1985. Effects of melatonin implants in ram lambs. J Reprod Fertil 73: 85-91.

12. Chemineau P, Malpaux B, Delgadillo JA, Guerin Y, Ravault JP, Thimonier J e coll. 1992. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. Anim Reprod Sci 30: 157-84.

13. Malpaux 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.

14. Arendt J. 2005. Melatonin in humans: it's about time. J Neuroendocrinol 17, 537–538.

15. De Reviers MM, Ravault JP, Tillet Y, Pelletier J. 1989. Melatonin binding sites in the sheep pars tuberalis. Neurosci Lett 100: 89-93.

16. Morgan PJ, Mercer JG. 1994. Control of seasonality by melatonin. Proc Nutr Soc 53: 483-493.

17. 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.

18. 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.

19. van Vuuren RJ, Pitout MJ, van Aswegen CH, Theron JJ (1992) Putative melatonin receptor in human spermatozoa. Clin Biochem 25:125–127.

20. Kokolis N, Theodosiadou E, Tsantarliotou 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.

21. 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.

22. Nuzzo NA, Anderson Ra Jr, Zaneveld LJD. 1990. Proacrosin and acrosin release during the guinea pig acrosome reaction. Mol Repro Dev 25: 52-60.

23. Palacin I, Abecia JA, Forcada F, Casao A, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T, Palacios C, Pontes JM 2008. Effect of exogenus melatonin treatment on out of season ram fertility. Ital. J. Anim. Sci. 7,199-206.

24. Casao A, Vega S, Palacin I, Perez- Pe R, Lavina A, Quintin FJ et al. 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.

25. Casao A, Mendoza N, Perez-Pe R, Grasa A, Abecia JA et al. 2010. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertlity rate. J. Pineal Res. 48,39-46

26. Sies H 1986. Biochemistry of ossidative stress. Angewandte Chemise International Edition in English 25, 1058-1071.

27. Marti E, Mara L, Martin JI, Muino-Blanco T, Cébrian-Pérez JA 2007. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. Theriogenology 67,1446-1454

28. Rosa HJD, Bryant MJ 2003.Seasonality of reproduction in sheep. Small Rumin. Res. 48,155-171

29. 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.

30. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ. 2004 Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. J Pineal Res. 36,1-9

31. Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Macías García B. 2009 Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. Reprod Domest Anim. 44,345-9.

32. Meyers SA. 2005 Spermatozoal response to osmotic stress. Anim Reprod Sci. 89,57-64.

33. Gillan L, Maxwell WM. 1999 The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. J Reprod Fertil Suppl. 54,271-83.

34. Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C 2000 Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing Mol Reprod Dev. 55,282-8.

35. Peris SI, Morrier A, Dufour M, Bailey JL 2004 Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay.J Androl. 25,224-33.

36. Fraser L, Strzezek J. 2005 Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. Reprod Domest Anim. 40,530-6.

37. Berlinguer F, Madeddu M, Pasciu V, Succu S, Spezzigu A, Satta V, Mereu P, Leoni GG, Naitana S 2009 Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. Reprod Biol Endocrinol.7-125

38. 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, 1010-1018.

39. León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. 2005 Melatonin mitigates mitochondrial malfunction .J Pineal Res. 38,1-9.

40. Acuña Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ 2002 Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases.Curr Top Med Chem. 2,133-51.

41. Miki K 2007 Energy metabolism and sperm function. Soc Reprod Fertil Suppl. 65,309-325.

42. Chemineau P, Guillaume D, Migaud M, Thiéry JC, Pellicer-Rubio MT, Malpaux B.Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications. Reprod Domest Anim. 2008 Jul;43 Suppl 2:40-7.

43. Colas G. Seasonal variations of the quality of sperm in the Ile-de-France ramI. Study of the cellular morphology and massal motility. Reprod Nutr Dev, 20 (1980), pp. 1789–1799

44. Courot M., Ortavant R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. J Reprod Fertil

Suppl, 30 (1981), pp. 47–60

45. Langford G.A., Ainsworth L., Marcus G.J., Shrestha J.N. Photoperiod entrainment of testosterone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and prolactin cycles in rams in relation to testis size and semen quality. Biol Reprod, 37 (1987), pp. 489–499.

46. Haresign W, Peters AR, Staples LD, The effect of melatonin implants on breeding activity and litter size in commercial sheep flocks in the UK. Anim Product 1990: 50, 111–121.

47. Zuniga O, Forcada F, Abecia JA, 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 2002: 72, 165–of 174

48. Faigl V, Keresztes M, Kulcsár M, Nagy S, Keresztes Z, Amiridis GS, Solti L, Huszenicza G, Cseh S. Testicular function and semen characteristics of Awassi rams treated with melatonin out of the breeding season. Acta Vet Hung. 2009 Dec;57(4):531-40.

Fitzgerald JA, Stellflug JN, Effects of melatonin on seasonal changes in reproduction of rams. J Anim Sci 1991: 69, 264–275.

50. Egerszegi, P. Sarlós, J. Rátky, L. Solti, V. Faigl, M. Kulcsár, S. Cseh. Effect of melatonin treatment on semen parameters and endocrine function in Black Racka rams out of the breeding season. Small Ruminant Research, In Press, Accepted Manuscript, Available online 15 November 2013

51. Sookhtehzari, A., Vojgsni, M., Niassari Naslaji, A., Bahonar, A., Gholami, G., Influence of melatonin treatment on scrotal circumference and semen parameters in Shall rams on out of season. J. Vet. Res. 2008. 65, 297–300.

52. Kaya A, Aksoy M, Baspõnar N, Yõldõz C and Ataman MB. Effect of Melatonin

Implantation to Sperm Donor Rams on Post-thaw Viability and Acrosomal Integrity of Sperm Cells in the Breeding and Non-breeding Season. Reprod Dom Anim 36, 211-215 (2001)

53. Casao A., I. Cebrian, M. Asumpcao, R. Perez-Pe, J. Abecia, F. Forcada, J. Cebrian-Perez, T. Muino-Blanco. Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. Reprod. Biol. Endocrinol., 8 (2010), p. 59

54. Lincoln GA, Clarke IJ, Refractoriness to a static melatonin signal develops in the pituitary gland for the control of prolactin secretion in the ram. Biol Reprod 1997: 57, 460–467.