



Università degli Studi di Sassari

Dipartimento di Medicina Veterinaria

**Dottorato di Ricerca in " Riproduzione, Produzione, Benessere Animale e
Sicurezza degli Alimenti di Origine Animale"**

(Direttore Prof. Sergio Ledda)

Indirizzo in " Riproduzione, Produzione e Benessere Animale"

CICLO XVII

**INFLUENZA DELL'AZIONE DEGLI
ANTIOSSIDANTI NELLA CAPACITÀ
FECONDANTE DEI GAMETI MASCHILI
E FEMMINILI**

Tesi di Dottorato della

Dott.ssa Daniela Addis

Docente guida:

Prof. Salvatore Naitana

Direttore:

Prof. Sergio Ledda

INDICE

Anno Accademico 2013-2014

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Il gamete maschile	6
<u>1.1.a Spermatogenesi</u>	7
<u>1.1.b Maturazione epididimale</u>	10
<u>1.1.c Capacitazione</u>	14
1.2 Il gamete femminile	17
<u>1.2.a Ovogenesi</u>	17
<u>1.2.b Follicologenesi</u>	19
1.3 Antiossidanti	22
<u>1.3.a Antiossidanti enzimatici o primari</u>	23
• Superossido dismutasi (SOD)	24
• Glutazione Perossidasi & Glutazione transferasi (GPx GST transferasi)	24
• Catalasi	25
<u>1.3 b Antiossidanti non enzimatici o secondari</u>	25
• Glutazione (GSH) e tioli (-SH) totali	25
• Altri antiossidanti non enzimatici	26
1.4 Stress ossidativo	26
<u>1.4.a Specie reattive dell'ossigeno (ROS)</u>	30
• Anione siperossido	31
• Perossido d'idrogeno	31
• Radicale idrossilico	31
• Ossigeno singoletto	32
1.5 Stress ossidativo nel testicolo	33
1.6 Stress ossidativo nell'ovaio	33
2. SCOPO DEL LAVORO	36
3. MATERIALI E METODI	39
3.1 Seme	39
<u>3.1.a Prelievo del materiale seminale e valutazione della funzionalità sperantica sul seme fresco</u>	39
• Ariete	39
• Verro	40
<u>3.1.b Vitalità spermatica</u>	40
<u>3.1.c Motilità</u>	41
<u>3.1.d Estrazione e dosaggio dell'ATP intracellulare del seme</u>	42
<u>3.1.e Plasma ed estratto cellulare</u>	43
3.2 Ovaie ed oociti	43
<u>3.2.a Raccolta e classificazione delle ovaie</u>	43
<u>3.2.b Analisi macroscopica delle ovaie</u>	44
<u>3.2.c Prelievo del liquido follicolare</u>	44
<u>3.2.d Prelievo oociti di suino</u>	45
<u>3.2.e Maturazione in vitro (IVM)</u>	46
<u>3.2.f Estrazione e dosaggio dell'ATP negli oociti</u>	47

<u>3.2.g Valutazione della funzionalità mitocondriale e dello stato ossidativo dell'oocita</u>	49
<u>3.2.h Fertilizzazione omologa (IVF)</u>	51
<u>3.2.i Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale</u>	53
3.3 Dosaggio dei parametri per valutare lo stato ossidativo del campione	53
3.3.a Il D-Roms test: dosaggio degli idroperossidi	53
3.3.b Determinazione della capacità antiossidante totale (TEAC)	54
3.3.c Dosaggio Malonildialdeide (MDA)	55
3.3.d Dosaggio della superossido dismutasi (SOD)	56
3.4 Disegno sperimentale	57
3.4.a 1° esperimento: Monitoraggio della Capacità antiossidante del seme di ariete e verro	57
3.4.b 2° esperimento: Monitoraggio delle capacità antiossidanti del liquido follicolare nei diversi mesi dell'anno.	57
3.4.c 3° esperimento: Valutazione percentuali di maturazione degli oociti con liquidi follicolari prelevati in diversi mesi.	58
3.4.d 4° esperimento: Valutazione percentuale di fertilizzazione degli oociti maturi con liquidi follicolari prelevati in diversi mesi.	59
3.4.e 5° esperimento: Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo utilizzo di diversi liquidi follicolari durante IVM	58
3.4.f 6° esperimento: Valutazione dell'attività mitocondriale e dello stato ossidativo degli oociti	59
3.5 Analisi statistica	59
4. RISULTATI	61
4.1 Risultati 1° esperimento	61
<u>4.1.a Ariete</u>	61
• Determinazione SOD	62
• Determinazione MDA	63
• Determinazione TEAC	64
• Determinazione idroperossidi con il test D-Roms	65
• Dosaggio ATP	65
<u>4.1.b Verro</u>	66
• Determinazione SOD	67
• Determinazione MDA	68
• Determinazione TEAC	69
• Determinazione idroperossidi con il test D-Roms	70
• Dosaggio ATP	70
4.2 Risultati 2° esperimento	70
• Determinazione SOD	71
• Determinazione MDA	71
• Determinazione TEAC	72
• Determinazione idroperossidi con il test D-Roms	72
4.3 Risultati 3° esperimento	73
4.4 Risultati 4° esperimento	73
4.5 Risultati 5° esperimento	74

4.6 Risultati 6° esperimento	74
5. DISCUSSIONE	78
6. CONCLUSIONI	87
7. BIBLIOGRAFIA	89

•

1. INTRODUZIONE

L'importanza delle continuità delle specie animali e i suoi notevoli riscontri economici, hanno portato da decenni il mondo scientifico a focalizzare l'attenzione su nuove strategie di riproduzione, sempre più perfezionate e volte a migliorare le capacità riproduttive sia in condizioni naturali che sperimentali. L'andamento dei cicli riproduttivi è correlato a diversi fattori di natura esogena (ambiente, fotoperiodo, temperatura, ecc...) ed endogena (ormoni, metaboliti, patologie, ecc...). L'interazione di questi fattori è indispensabile per la riuscita del ciclo riproduttivo e per questo si è fatta sempre più importante l'esigenza di conoscerne i precisi meccanismi che la regolano. Gli ormoni svolgono un ruolo fondamentale nella cascata di eventi che contribuiscono alla produzione dei gameti. Essi agiscono mediante l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, inviando segnali che, come è ormai noto dalla letteratura, si servono di specifici recettori e antiossidanti che contribuiscono alla formazione e maturazione dei gameti (Guerriero, 2009; Zhang *et al.*, 2010). Dall'ipotalamo il GnRH (ormone per il rilascio delle gonadotropine) regola la sintesi e il rilascio degli ormoni ipofisari LH ed FSH, in modo che questi a loro volta, inviino i segnali all' ovaio e al testicolo per l'avvio della gametogenesi e della steroidogenesi. Gli ormoni steroidei sessuali (estrogeni, androgeni e progesterone) insieme all' LH ed all' FSH favoriscono la maturazione dei gameti e regolano l'attività dell'asse ipotalamo-ipofisario grazie alla presenza di specifici recettori nucleari (Guerriero, 2009; Zhang *et al.*, 2010). A livello gonadico, l'attivazione del complesso ormone-recettore è condizionato dalla presenza di svariate molecole, fra le quali gli antiossidanti.

Questi infatti neutralizzano o limitano la produzione eccessiva di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che potrebbero bloccare le diverse fasi meiotiche (Parminder e Bansal, 2003)

1.1 IL GAMETE MASCHILE

Lo spermatozoo è una cellula aploide, quasi del tutto priva di citoplasma, costituita da un grande nucleo, con cromosomi condensati che ostacolano l'attività trascrizionale per il rimpiazzo delle proteine, un acrosoma e una serie di mitocondri localizzati nella parte anteriore del flagello (Eddy e O'Brein, 1994). Lo spermatozoo è formato da tre regioni: testa, collo e coda, suddivisa a sua volta in un segmento intermedio, uno principale e uno terminale. La testa è costituita quasi esclusivamente dal nucleo che contiene il materiale genetico. Il nucleo nella parte rostrale della testa è coperto da una struttura altamente specializzata, chiamata cappuccio acrosomiale, vescicola che origina dall'apparato del Golgi e che contiene gli enzimi che andranno a lisare la zona pellucida dell'oocita al momento della penetrazione. Il collo e la coda invece contengono le strutture adibite al movimento e un sistema di microtubuli chiamato assonema. Nel collo, il sito di connessione tra la testa e la coda, sono localizzati i mitocondri che producono energia sotto forma di ATP e i centrioli dai quali origina il sistema di microtubuli. Anche il segmento intermedio contiene molti mitocondri che si dispongono lungo la circonferenza dell'assonema a formare una doppia spirale. L'assonema occupa tutta la lunghezza della coda. Il citoplasma è ridotto al minimo e non devono esserci corpi citoplasmatici residui (McKinnon e Voss, 1993). La cellula spermatica, come ogni altra cellula, è avvolta da una membrana plasmatica a doppio strato fosfolipidico.

Il colesterolo è il principale sterolo presente, serve per mantenere stabile l'organizzazione lamellare dei fosfolipidi ed è determinante nella modulazione della fluidità della membrana (Aurich, 2005); infatti più colesterolo è presente in una determinata regione, meno fluida o flessibile sarà la membrana stessa (McKinnon e Voss, 1993).

La composizione lipidica e il contenuto di colesterolo varia tra specie, individui ed eiaculati dello stesso individuo, è correlata alla velocità di capacitazione e può anche influenzare la fertilità e l'adattabilità alla refrigerazione e al congelamento (concetto di good e bad freezer/cooler) (Aurich, 2005; Maldjian *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2000). Le proteine contenute nella membrana cellulare si aggirano attorno al 50% e sono importanti perché formano recettori, canali di membrana e si legano a recettori epiteliali e a quelli presenti sulla zona pellucida dell'oocita (McKinnon e Voss, 1993). La loro quantità e distribuzione si modifica durante lo stoccaggio nell'epididimo e la capacitazione. La membrana cellulare è ancorata alle strutture circostanti, riveste tutta la superficie cellulare ma durante la reazione acrosomiale la porzione che ricopre l'acrosoma viene persa e permette la liberazione degli enzimi idrolitici. Essa inoltre va incontro a modificazioni strutturali e fisiologiche durante la fase di capacitazione (McKinnon e Voss, 1993).

1.1.a Spermatogenesi

In considerazione delle sue caratteristiche strutturali il gamete maschile viene riconosciuto come una delle cellule più differenziate presenti nell'organismo animale della classe dei mammiferi. Per poter raggiungere il suo peculiare aspetto morfologico lo spermatozoo subisce una lunga serie di trasformazioni a partire dallo spermatogonio di tipo B, che rappresenta la cellula dismessa dal comparto germinale indifferenziato

costituito dalla popolazione di spermatogoni di tipo A. Subito dopo la dismissione da tale comparto lo spermatogonio inizia una fase di profonde modificazioni che possono essere suddivise in due momenti: spermatogenesi e spermioistogenesi. La spermatogenesi si divide a sua volta in due fasi: la prima fase, che è quella della mitosi, comprende la moltiplicazione per mitosi e la maturazione degli spermatogoni; la seconda fase, quella della meiosi, interessa invece gli spermatociti primari e comprende le due divisioni meiotiche che terminano con la produzione degli spermatidi aploidi. La spermioistogenesi invece comporta una serie di modificazioni morfologiche e funzionali che portano alla trasformazione degli spermatidi in spermatozoi. Le cellule germinali sono distribuite dalla periferia al centro dei tubuli seminiferi, a seconda della fase di sviluppo: alla periferia sono presenti gli spermatogoni che poggiano sulla lamina basale, seguono verso il centro una o due generazioni di spermatociti e una o due generazioni di spermatidi. Nelle sezioni del tubulo seminifero si possono riscontrare diversi tipi di spermatogoni, che rappresentano stadi successivi di un processo maturativi; si distinguono infatti, a seconda della conformazione del nucleo e della distribuzione della cromatina al suo interno, spermatogoni di tipo A, di tipo intermedio e di tipo B. Più in particolare, la spermatogenesi inizia con uno spermatogonio A_1 , che si divide quattro volte producendo spermatogoni A_2 , A_3 , A_4 e spermatogoni intermedi; questi ultimi si dividono una sola volta dando origine agli spermatogoni di tipo B, la cui ulteriore divisione porta alla formazione degli spermatociti primari che iniziano la meiosi. E' evidente, tuttavia, che non tutti gli spermatogoni A si trasformano in spermatociti e quindi in spermatozoi, altrimenti la spermatogenesi si arresterebbe non appena differenziati tutti gli spermatogoni A.

La popolazione degli spermatogoni A deve quindi comprendere elementi staminali, dotati della capacità di dividersi indefinitamente, mantenendo costante il proprio numero e nel contempo di differenziarsi in spermatozoi. Esiste una popolazione di spermatogoni di tipo A (A_s) che si divide in maniera bivalente, per formare cellule staminali, che resteranno quiescenti durante tutto il ciclo di replicazione dell'epitelio seminifero e spermatogoni di tipo A_1 , che invece entrano a far parte del ciclo. Ad ogni modo, la fase successiva della spermatogenesi, inizia con la prima delle due divisioni meiotiche, che dagli spermatociti primari e attraverso lo stadio di spermatociti secondari, portano alla formazione degli spermatidi. Queste cellule aploidi non sono destinate ad ulteriori divisioni, ma subiranno un complesso processo di trasformazione, denominato spermioistogenesi, che darà origine agli spermatozoi. Le modificazioni più significative che hanno luogo durante questa fase riguardano fondamentalmente la forma generale della cellula, il nucleo, la condensazione della cromatina che diventa inattiva nella trascrizione dell'RNA, lo sviluppo del flagello e la differenziazione dell'acrosoma. Inoltre, alla fine della spermioistogenesi, la maggior parte del citoplasma viene eliminata dalla cellula, costituendo i cosiddetti "corpi residuali" che vengono fagocitati dalle cellule del Sertoli. Tuttavia, rimane attaccata allo spermatide una piccola porzione di citoplasma, che sarà eliminata durante la maturazione dello spermatozoo nell'epididimo. Ultimata la fase di spermioistogenesi lo spermatozoo viene rilasciato nel lume del tubulo seminifero dalla cellula del Sertoli, che lo ha difeso da possibili azioni di tipo immunologico grazie alla barriera ematotesticolare, lo ha alloggiato assecondandolo nelle modificazioni del suo citoplasma e lo ha supportato metabolicamente fornendogli le energie ed i substrati necessari per le trasformazioni cui gradatamente andava incontro.

In questa fase il gamete maschile risulta morfologicamente molto simile allo spermatozoo maturo, ma la sua completa maturazione viene acquisita allorché raggiunge, con il liquido presente nel tubulo seminifero, l'epididimo. Se nel tubulo seminifero la trasformazione dello spermatogonio di tipo B è stata esclusivamente strutturale, in questo organo invece lo spermatozoo acquista tutti gli aspetti più strettamente funzionali, in grado di conferire alla cellula la capacità fecondante (De Jonge e Barrat, , 2006).

1.2 b Maturazione epididimale

L'epididimo è un lungo dotto ripiegato su stesso che collega i canalicoli efferenti testicolari al deferente, viene generalmente suddiviso in tre regioni: la testa, il corpo e la coda. L'epitelio che tappezza il suo lume è costituito da cinque tipi cellulari, che hanno sia una funzione assorbente che secernente. La composizione del liquido epididimale, comprendente acqua, ioni, piccole molecole inorganiche, proteine e glicoproteine è infatti nettamente differente da quella del sangue o dei liquidi interstiziali, grazie alla selettiva captazione e concentrazione di ioni e piccole molecole da parte delle sue cellule. La maggior parte del liquido prodotto dal testicolo viene riassorbito e ciò avviene soprattutto nei dotti efferenti e nella testa dell'epididimo, favorendo così una maggior concentrazione degli spermatozoi nella coda ed un incremento dell'osmolarità. Ma la caratteristica più importante del liquido epididimale è che la sua composizione sembra essere segmento specifica, così che gli spermatozoi sono esposti costantemente ad ambienti differenti man mano che proseguono lungo il loro tragitto. La maturazione degli spermatozoi che si ha durante il passaggio lungo l'epididimo non è infatti un processo passivo, nel senso che non è sufficiente il semplice passaggio di tempo (circa 9-14 giorni), ma è necessaria l'esposizione al mutevole ambiente epididimale.

Questa comporta notevoli modificazioni funzionali quali ad esempio l'acquisizione della motilità, una progressiva perdita di acqua, la migrazione in posizione distale e l'eventuale perdita della goccia citoplasmatica. In particolare, l'acquisizione dell'attiva motilità rappresenta uno dei più importanti cambiamenti funzionali che si accompagnano alla maturazione degli spermatozoi ed è una condizione necessaria ma non sufficiente a garantirne la capacità fecondante. Lo sblocco dei meccanismi regolanti la motilità durante la maturazione potrebbe essere dovuto all'interazione con i secreti epididimali, considerando i vari cambiamenti nella composizione del liquido epididimale ai diversi livelli del dotto e l'influenza che questi possono avere nei confronti della concentrazione intracellulare di calcio, di AMPc e del pH. Si è visto che la motilità, infatti, è controllata dall'interazione di questi tre fattori. I livelli di AMPc sono cruciali e rappresentano sempre un equilibrio tra l'attività dell'adenilato ciclasi e quella della fosfodiesterasi, che a loro volta sono influenzate dal calcio e dal pH. L'AMPc attiva una protein chinasi, che fosforila delle proteine axonemiche e stimola così l'attività flagellare. Questa è invece inibita da una fosfatasi, a sua volta sotto il controllo di specifici inibitori. L'energia per l'attività dello spermatozoo deriva ovviamente dall'ATP, che viene demolito dalla molecola della dineina alloggiata nel flagello. Il processo della maturazione epididimale è caratterizzato anche da modificazioni a livello dell'acrosina. L'acrosina, una proteasi acrosomiale, è infatti sintetizzata sotto forma di un precursore enzimaticamente inattivo, la proacrosina. Quest'ultima verrebbe parzialmente convertita ad acrosina durante il tragitto lungo l'epididimo, preparandosi così alla conversione totale che avverrà al momento della reazione acrosomiale. L'intera morfologia del nucleo spermatico non cambia significativamente durante la maturazione, solo la cromatina viene ulteriormente stabilizzata da ponti disolfuro fra molecole proteiche a livello dell'aminoacido cisteina, direttamente o tramite l'interposizione di atomi di zinco.

La stabilizzazione della cromatina nucleare inizia con la sostituzione degli istoni con le protammine nell'ultima fase della spermiogenesi. Il materiale genetico risulta così ben protetto, circa 6 volte maggiore della cromatina nucleare presente durante la metafase, fino al momento della fecondazione. La forma affusolata della testa favorisce la sua progressione nei fluidi dell'apparato genitale femminile fino all'incontro con l'oocita. Nel corso della fecondazione avviene il processo inverso, le protammine devono essere riconvertite ad istoni per permettere la decondensazione del DNA nucleare dello spermatozoo ed iniziare la formazione del pronucleo maschile. Le più significative modificazioni durante il corso della maturazione epididimale avvengono a livello della membrana plasmatica dello spermatozoo, quest'ultima infatti è direttamente esposta al fluido epididimale e viene modificata passo dopo passo quando lo spermatozoo attraversa le diverse regioni dell'epididimo (e i diversi ambienti). La membrana plasmatica è già ricoperta da numerose molecole quando gli spermatozoi lasciano il testicolo. Durante il passaggio lungo l'epididimo queste preesistenti molecole sono sia perse che modificate, mentre nuove macromolecole di origine epididimale vengono assorbite o integrate alla membrana plasmatica. L'alterazione delle glicoproteine preesistenti e l'assorbimento di nuove sembra essere mediato, almeno in parte, da enzimi epididimali, mentre la perdita nelle componenti della superficie spermatica potrebbe essere dovuta a tre fattori: il distacco dalla membrana, la modificazione nel peso molecolare a causa di una limitata proteolisi o per aggiunta di nuove molecole oppure il mascheramento da parte di altre molecole. È importante notare che le modificazioni coinvolgenti particolari componenti della membrana spesso occorrono in specifiche regioni dell'epididimo, suggerendo che la specializzazione nelle funzioni epididimali di queste regioni gioca un ruolo importante nei cambiamenti della superficie spermatica durante la maturazione epididimale.

Sempre durante il transito epididimale matura il sistema che permette il riconoscimento e l'adesione dello spermatozoo alla zona pellucida. Tali modifiche interessano i residui della galattosiltransferasi, che riconoscono specifici siti glicoproteici della zona pellucida denominati ZP3. La presenza di queste proteine nel liquido epididimale è strettamente dipendente dalla concentrazione degli androgeni. Queste proteine hanno anche un'importante funzione durante la fecondazione nel riconoscimento specie-specifico, impedendo eventuali fertilizzazioni interspecifiche. Le glicoproteine non sono le uniche macromolecole che vengono modificate durante il tragitto lungo l'epididimo, anche i lipidi di membrana subiscono cambiamenti nelle loro caratteristiche fisiche e chimiche. Diminuisce così la percentuale di lipidi fosforati per cellula e molte classi di lipidi mostrano specifici cambiamenti nei loro acidi grassi costitutivi; aumenta la percentuale di acidi grassi insaturi, motivo per il quale gli spermatozoi diventano più sensibili agli insulti ossidativi e allo shock termico, mentre diminuisce il contenuto in colesterolo, con conseguente modificazione della fluidità di membrana. La maggior parte di queste modificazioni si hanno a livello della membrana plasmatica che ricopre il cappuccio acrosomiale, anche se in realtà tutta la superficie cellulare è coinvolta in questo processo. La maturazione epididimale si completa quando gli spermatozoi raggiungono la coda dell'epididimo. In questa sede l'ambiente è molto favorevole alla loro sopravvivenza, tanto che essi possono restare immagazzinati in questo tessuto per lunghi periodi conservando le proprie funzioni. Le cellule spermatiche non rimangono vitali indefinitamente, vanno incontro ad un graduale invecchiamento che comporta dapprima la perdita della capacità fecondante, poi della motilità ed infine la loro degenerazione nel dotto deferente. Pertanto se gli spermatozoi invecchiati non vengono eliminati dall'apparato riproduttore maschile ad intervalli regolari il seme sarà di qualità scadente.

Il turnover degli spermatozoi è comunque abbastanza rapido, molti di essi infatti vengono eliminati giornalmente con l'urina, giustificando così la loro continua produzione. Tutte le modifiche che lo spermatozoo subisce nel tratto epididimale sono sotto stretto controllo del testosterone che, prodotto dal testicolo, arriva all'epididimo con il liquido testicolare. Nell'epididimo l'elevata produzione dell'enzima 5-alfa-reduttasi permette la trasformazione del testosterone in diidro-testosterone, che rappresenta la forma ormonale attiva (De Jonge e Barrat, 2006).

1.3.c Capacitazione

Anche se nel complesso le modifiche che avvengono durante la maturazione epididimale hanno lo scopo di rendere lo spermatozoo maggiormente resistente e più idoneo alla fecondazione, gli spermatozoi eiaculati non sono ancora capaci di fertilizzare la cellula uovo. Essi infatti, prima di guadagnare questa abilità, devono venire a contatto con le secrezioni dell'apparato genitale femminile e sostare per qualche tempo al suo interno. Durante questo periodo gli spermatozoi subiscono delle modificazioni fisiologiche e funzionali, chiamate nel loro insieme capacitazione, che li rendono pronti a portare avanti il processo di fertilizzazione, tramite legame alla zona pellucida dell'ocita e attivazione della reazione acrosomiale (McKinnon, Voss, 1993). Pertanto le maggiori modificazioni che si verificano durante la capacitazione interessano sicuramente la membrana cellulare. Queste modificazioni sono rappresentate dalla rimozione del colesterolo dal doppio strato fosfolipidico ad opera di albumine presenti nell'ambiente genitale femminile e dall'alterazione del contenuto proteico di membrana, che portano ad un aumento della fluidità, a modificazioni del flusso ionico transmembrana (in particolare l'ingresso

massivo di ioni Ca^{2+} nella cellula), all'esposizione di siti recettoriali e alla rimozione dalla membrana di molecole che ricoprono il flagello e che sembrano impedire il suo movimento iperattivo. Le modificazioni a carico della membrana che ricopre la testa facilitano quindi il legame dello spermatozoo alla zona pellucida dell'ocita e l'innesco della reazione acrosomiale, quelle a carico della membrana che ricopre il flagello invece favoriscono la motilità iperattiva e i cambiamenti a carico della membrana mitocondriale, aumentano il metabolismo e agevolano la trasmissione di energia (McKinnon, Voss, 1993). E' noto che, sia durante la maturazione epididimale che in seguito all'esposizione al plasma seminale, la membrana plasmatica dello spermatozoo viene stabilizzata dall'assorbimento o dall'integrazione di glicoproteine epididimali da una parte e componenti del plasma seminale dall'altra, queste ultime sembrano legarsi saldamente alla superficie degli spermatozoi eiaculati. La capacitazione consiste, almeno in parte, nella graduale rimozione di questo materiale coprente la superficie della membrana spermatica, soprattutto nella regione acrosomiale. Questo porta all'esposizione di siti recettoriali che interagiscono specificatamente con i recettori della cellula uovo, permettendo così il riconoscimento tra i due gameti. Inoltre le modificazioni morfologiche che si verificano a carico del plasmalemma durante la capacitazione portano alla formazione, a livello della regione acrosomiale, di aree specifiche in cui sono presenti particolari proteine intramembrana ed un'elevata concentrazione di fosfolipidi anionici. Queste aree mostrano poi proprietà fusogeniche quando si sviluppano le condizioni appropriate affinché si abbia la reazione acrosomiale. Questo evento è considerato uno dei maggiori indicatori dell'avvenuta capacitazione. Anche a livello del contenuto acrosomiale si hanno importanti modificazioni funzionali, fra cui un aumento del pH, che provoca la conversione della proacrosina in acrosina attiva, essenziale per la penetrazione dei rivestimenti dell'ocita al momento della fertilizzazione. Le

modificazioni a carico della membrana cellulare spermatica portano anche ad un'aumentata permeabilità nei confronti degli ioni calcio e l'aumento del calcio intracellulare è un requisito fondamentale per la capacitazione, rende infatti lo spermatozoo capace di portare avanti la reazione acrosomiale. Inoltre, elevati livelli intracellulari di calcio potrebbero essere coinvolti nell'attivazione dell'acrosina, nelle modificazioni della membrana acrosomiale che precedono la vescicolazione e nel controllo dell'adenilato ciclasi. Di conseguenza i fattori che influenzano la disponibilità del calcio e il suo uptake sono di massima importanza ai fini della capacitazione. E' noto che il plasma seminale contiene delle proteine a basso peso molecolare chelanti il calcio e dei fattori che ne inibiscono l'uptake da parte dello spermatozoo. All'interno dell'apparato genitale femminile invece la concentrazione del calcio extracellulare varia a seconda del tratto preso in considerazione e a livello dell'ovidotto varia anche a seconda del suo segmento specifico. Inoltre, è stato dimostrato come il microambiente tubarico è più capacitante di quello uterino, anche se il tempo minimo richiesto per una completa capacitazione da parte degli spermatozoi sembra essere sempre minore quando questi percorrono l'intero tratto genitale femminile (Hunter e Hall, 1974). Questo indica che probabilmente esiste un sinergismo tra l'ambiente tubarico e quello uterino ai fini della capacitazione spermatica. Il potere capacitante del tratto genitale femminile varia anche a seconda del quadro ormonale della femmina, così come varia la concentrazione del calcio cellulare al suo interno (Clegg, 1983). Infatti, elevati livelli di estrogeni sembrano promuovere la capacitazione spermatica all'interno dell'utero, mentre il progesterone sembra agire in senso opposto (Bedford, 1974). A livello dell'ovidotto il ruolo del progesterone nel controllo della disponibilità extracellulare di calcio è molto più complesso, perché influenza non tanto la capacitazione, quanto l'attivazione controllata ed il rilascio di una certa quota di spermatozoi competenti dalle riserve dell'istmo al

momento dell'ovulazione (Hunter, 1999). Un altro cambiamento evidente mostrato dalla cellula spermatica durante questo periodo riguarda la modificazione della motilità flagellare. Gli spermatozoi presenti nella coda dell'epididimo o provenienti da un eiaculato mostrano una motilità lineare progressiva con un'ampiezza di movimento del flagello abbastanza caratteristica. Durante la capacitazione l'ingresso di ioni calcio determina un aumento dell'ampiezza del movimento flagellare con l'acquisizione di una notevole ipermotilità, dovuta ad una fosforilazione delle proteine plasmatiche. Per la capacitazione sono richieste mediamente 6-8 ore, mentre la sopravvivenza degli spermatozoi all'interno dell'apparato genitale femminile può essere di diversi giorni, in alcune specie si può arrivare anche ad alcune settimane (De Jonge e Barrat, 2006).

1.2 IL GAMETE FEMMINILE

2.1 a Ovogenesi

Gli ovociti di mammifero sono cellule altamente specializzate (Hutt et al. 2007) aploidi e competenti al successivo sviluppo embrionale (Russe et al. 1983). Durante la vita fetale, le cellule germinali primordiali migrano dall'endoderma del sacco vitellino verso le creste genitali, dove diventano oogoni. Dopo un'intensa proliferazione mitotica, decisiva per la formazione della riserva di ovociti che coprirà l'intera vita riproduttiva, inizia la sintesi del DNA funzionale alla meiosi e l'oogone diventa così ovocita primario. Durante le fasi terminali della vita fetale, gli ovociti iniziano la meiosi attraversando gli stadi transitori della profase della prima divisione meiotica. Ogni cromosoma comincia a condensarsi, diventa più spesso e si allinea al suo omologo per formare una tetrad di quattro cromatidi.

Prima della nascita, tutta la riserva di ovociti rimane bloccata allo stadio di diplotene, noto come stadio di vescicola germinale. In molte specie i cromosomi si decondensano in modo più o meno esteso e diventano trascrizionalmente attivi pur rimanendo così arrestati fino al raggiungimento della maturità sessuale (Picton et al.1998). L'arresto meiotico si protrae per diversi mesi o anni secondo la specie (Tripathi et al.2010) Durante questo periodo, gli ovociti crescono in dimensioni del gamete e si notano modificazioni strutturali, quali la redistribuzione degli organuli citoplasmatici in posizione periferica, la comparsa dello spazio perivitellino, la riduzione del reticolo endoplasmatico sia liscio che rugoso (Motta et al. 2000) e un'intensa attività trascrizionale e traduzionale. Appena prima del picco preovulatorio dell'ormone luteotropo (LH), aumenta il contenuto lipidico dell'ovocita, l'apparato di Golgi si riduce e i granuli corticali si spostano completamente verso l'oolemma. In seguito allo stimolo dell'LH, riprende la meiosi, si osserva la rottura della vescicola germinale e la formazione del fuso meiotico che si porta verso la superficie dell'ovocita. La prima divisione meiotica prosegue con la ripartizione delle diadi in due cellule, una corrispondente a quasi tutto l'ovocita iniziale, l'altra si trasforma nel primo globulo polare. A questo punto il ciclo dell'ovocita si arresta alla metafase della seconda divisione, dove rimane fino alla fecondazione (Tripathi et al. 2010). Durante la seconda divisione meiotica l'ovocita secondario si divide in una cellula aploide che conserva quasi tutto il citoplasma ed in un secondo globulo polare che, come il primo, ha solo la funzione di eliminare la metà del patrimonio cromosomico dell'ovocita senza intaccare i materiali di riserva accumulati nel citoplasma. Il peculiare meccanismo di divisione cellulare, proprio del gamete femminile, assicura dunque l'accumulo di RNA messaggeri, di ribosomi e di polipeptidi che verranno utilizzati dall'embrione nelle successive fasi di sviluppo fino all'attivazione del genoma embrionale (Fair et al.2010).

2.2. b *Follicologenesi*

Il follicolo rappresenta l'unità funzionale dell'ovaio dei Mammiferi. Esso separa l'ovocita dai tessuti ovarici circostanti, "accogliendo" così il gamete e creando un ambiente adatto per le successive fasi di crescita e maturazione. Le cellule germinali primordiali sono situate nella parte più interna della corticale ovarica e, non appena raggiungono lo stadio di diplotene della I divisione meiotica, vengono circondate da un singolo strato di cellule mesodermiche appiattite, precursori delle cellule della granulosa, sostenute da una membrana basale completa: si formano in questo modo i *follicoli primordiali*. I cambiamenti morfologici e funzionali che avvengono durante l'ovogenesi sono accompagnati da importanti modificazioni della struttura follicolare, nota con il termine di follicologenesi (Fig. 1.2.2).

Molecole che potrebbero essere coinvolte nella formazione del follicolo primordiale sono i fattori di crescita della famiglia dei "transforming growth factor β " (TGF β) (Knight et al.2006).

Durante l'attivazione dei follicoli primordiali, le cellule della granulosa diventano cubiche e cominciano a proliferare (Braw-Tal et al.1997) È stato ipotizzato che l'attivazione del follicolo primordiale sia dovuta a fattori che stimolano la loro proliferazione. In questo contesto la "bone morphogenetic protein-7" (BMP-7) nel ratto (Lee et al.2001) l'"insuline-like growth factor-I" (IGF-I) nella pecora, nel ratto, nel suino e nell'uomo (Adashi et al. 1992) e l'"epidermal growth factor" (EGF) (Hsu et al.1987) sono molecole che potrebbero essere coinvolte in questa fase della follicologenesi, poiché è stato dimostrato che sono in grado di stimolare la proliferazione ed il differenziamento delle cellule della granulosa. Il passaggio da follicolo primordiale a *follicolo primario* è caratterizzato dalla deposizione di una sostanza glicoproteica che andrà a costituire la zona pellucida (Greenwald et al.1988). A

partire da questo momento, gli strati di cellule della granulosa aumentano di numero, si accresce il diametro dell'ovocita ed il follicolo si ingrandisce, diventando *secondario*. Queste modificazioni si accompagnano anche a cambiamenti del citoplasma della cellula uovo, nella quale si osserva, fra l'altro, la formazione dei granuli corticali.

A questo stadio di sviluppo i follicoli cominciano ad essere sensibili alle gonadotropine. Infatti, studi condotti nel bovino, nell'ovino e nel ratto (Bao et al. 1998) hanno dimostrato che l'RNA messaggero del recettore per l'FSH è espresso nei follicoli che presentano da uno a due strati di cellule della granulosa. Quando l'ovocita è circondato da 2-7 strati di cellule della granulosa, comincia a formarsi l'antro, una cavità che viene gradualmente riempita dal fluido follicolare. A questo punto il follicolo si trova allo stadio di *follicolo antrale precoce*. Le cellule della granulosa si differenziano in due sottopopolazioni: le cellule della granulosa murale, disposte lungo la parete del follicolo e le cellule del cumulo ooforo più strettamente associate all'ovocita (Driancourt et al. 1991). Nella transizione da follicolo primario a secondario si osserva l'inizio della formazione delle giunzioni di tipo gap ("gap junctions") tra ovocita e cellule del cumulo ooforo e tra cellule della granulosa. Lo sviluppo di questo sistema di comunicazione e il cosiddetto "cross-talk" fra compartimento somatico e germinale sono fondamentali per la follicologenesi, la crescita dell'ovocita e l'acquisizione della sua competenza allo sviluppo (Eppig et al. 1991). Contemporaneamente si osserva, a partire dallo stroma perifollicolare, la proliferazione di altri elementi cellulari che vanno a costituire la teca interna e la teca esterna. Numerosi piccoli vasi attraversano la teca esterna per formare un ricco plesso di capillari nella teca interna, mentre lo strato delle cellule della granulosa rimane privo di vasi per tutto il periodo di accrescimento del follicolo. Durante la formazione della teca interna è già possibile rilevare l'RNA messaggero del recettore dell'LH nelle cellule della teca (Xu et al. 1995).

I follicoli antrali continuano a crescere ed aumentano di dimensioni fino a raggiungere lo stadio di *follicolo preovulatorio* o di *Graaf*. All'interno del follicolo ovulatorio l'ovocita raggiunge il diametro finale e appare circondato da numerosi strati di cellule del cumulo ooforo che, nelle ultime fasi della crescita follicolare, perdono gradatamente le connessioni con l'ovocita. La disgregazione del cumulo ooforo non coinvolge però lo strato di cellule disposto radialmente intorno all'ovocita, che nell'insieme costituisce la corona radiata la quale circonda il gamete anche dopo l'ovulazione. L'accrescimento e lo sviluppo dei follicoli si accompagnano a modificazioni dei gameti in essi contenuti. Durante la follicologenesi, l'ovocita acquisisce gradualmente la capacità di riprendere e completare la divisione meiotica (competenza meiotica) ed intraprendere lo sviluppo embrionale dopo la fecondazione (competenza di sviluppo) (Eppig et al. 1996)

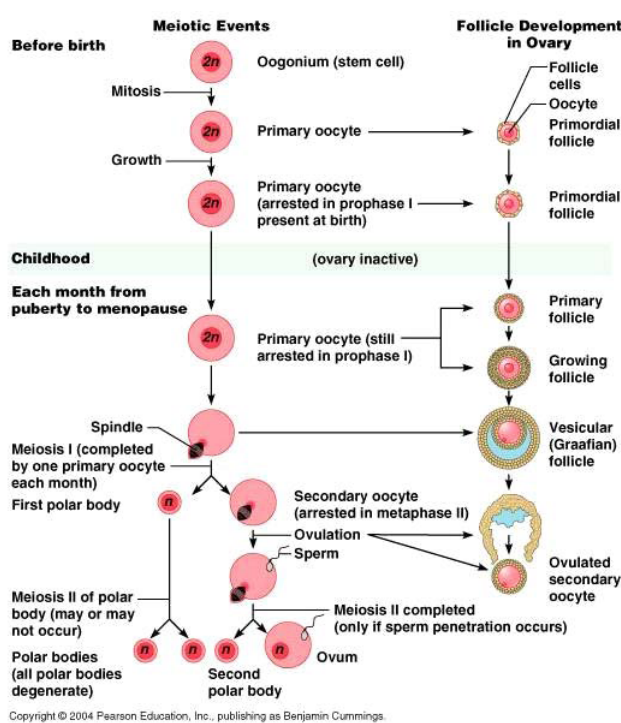


Figura 1: Rappresentazione schematica di ovogenesi e follicolo genesi

1.3 ANTIOSSIDANTI

Gli antiossidanti sono molecole, ioni o radicali deputati a prevenire o rallentare le reazioni di ossidazione nelle cellule. L'ossidazione è una reazione chimica che trasferisce elettroni da una sostanza ad un ossidante e può produrre radicali liberi, responsabili dell'avvio di una reazione a catena che danneggia le cellule; gli antiossidanti intervenendo sui radicali intermedi ed inibendo altre reazioni di ossidazione facendo ossidare se stessi. Per questo, nel linguaggio chimico tecnico, gli antiossidanti sono definiti agenti riducenti - come tioli o polifenoli - in quanto le reazioni chimiche coinvolte sono di ossido-riduzione.

Anche se le reazioni di ossidazione sono fondamentali per la vita, possono essere altrettanto dannose.

Gli antiossidanti sono composti in grado di proteggere le cellule dai danni provocati dall'ossidazione indotta da radicali. (Neild *et al.*, 2005; Golas *et al.*, 2010). I radicali liberi possono attaccare qualsiasi molecola del nostro organismo danneggiando cellule, organi e apparati. Tuttavia l'organismo animale presenta dei sistemi di difesa estremamente efficaci che permettono di neutralizzare i ROS e di bloccare la loro attività ossidante (Fig. 2). In generale, i sistemi antiossidanti o prevengono la formazione di queste specie ossidanti o le rimuovono prima che possano danneggiare i componenti vitali delle cellule (Swamy, 2009).

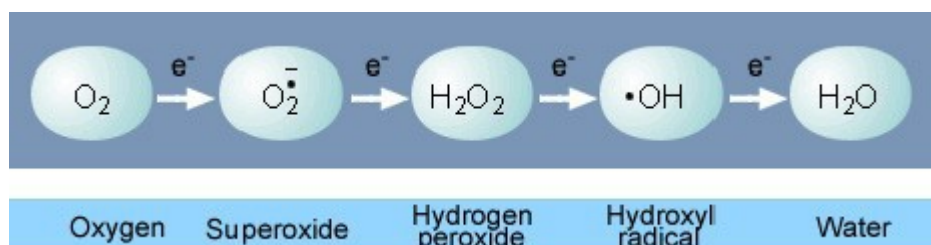


Figura 2. Inattivazione dei composti reattivi dell'Ossigeno (ROS)

La capacità protettiva di un antiossidante dipende dalla sua concentrazione, dalla sua reattività verso la particolare specie reattiva dell'ossigeno considerata e lo stato degli antiossidanti con cui interagisce (Vertuani *at al.*, 2004). Le cellule possiedono un complesso sistema di difesa (Fig.3) che tenta di inibire la formazione dei radicali dell'ossigeno (Swamy, 2009).

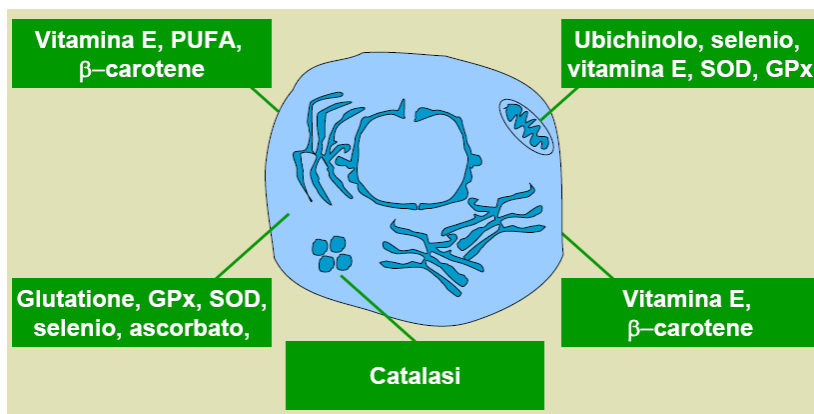


Figura 3. Distribuzione del sistema antiossidante nella cellula

Gli antiossidanti si possono classificare in *antiossidanti primari* o *di tipo enzimatico* e *antiossidanti secondari* o *non enzimatici* (Swamy, 2009).

3.1 a Antiossidanti enzimatici o primari

Sono enzimi in grado di detossificare la cellula dai ROS attraverso delle reazioni enzimatiche in cui le specie radicaliche dell'ossigeno perdono la loro reattività e vengono trasformate in sostanze innocue per la cellula (Fig. 4).

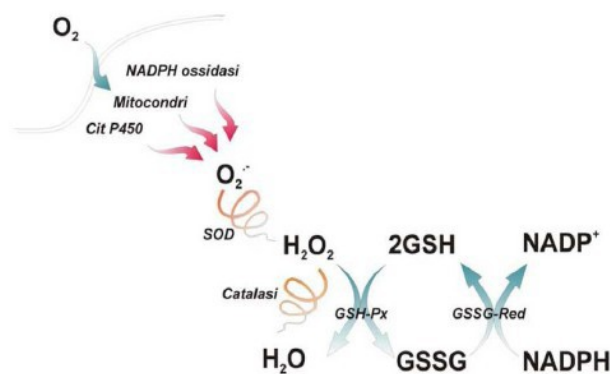
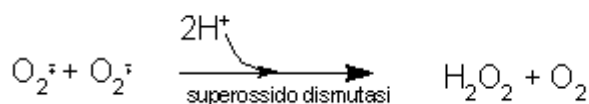


Figura 4. Principali difese antiossidanti enzimatiche. SOD (superossido dismutasi); GSHPx (glutazione perossidasi); GSSG-Red (Glutazione Redattasi); Catalasi.

- Superossido Dismutasi (SOD)

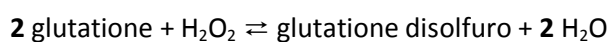
L'enzima superossido dismutasi (SOD) è stato scoperto nel 1969 da McCord e Fridovich e rappresenta la prima difesa nei confronti dei ROS e in particolare del radicale superossido. La SOD infatti catalizza la reazione di dismutazione del radicale superossido in perossido di idrogeno e ossigeno molecolare.



Si conoscono tre isoforme dell'enzima SOD (SOD-1, SOD-2 e SOD-3) e tutte hanno la caratteristica di avere un metallo di transizione redox attivo nel loro sito catalitico necessario per catalizzare la reazione di dismutazione (Culotta *et al.*, 2006). Le diverse isoforme dell'enzima SOD si differenziano sia per il diverso catione metallico che funge da cofattore, sia per la diversa localizzazione; si distinguono una Cu, Zn SOD (SOD1) localizzata principalmente a livello della zona citoplasmatica e nello spazio intermembrana, una Mn SOD (SOD2) principalmente presente nella matrice mitocondriale e una Fe-SOD (SOD-3) localizzata nello spazio extracellulare.

- Glutazione Perossidasi & Glutazione transferasi (GPx GST transferasi)

La Glutazione Perossidasi (GPx) è un altro enzima fondamentale nella detossificazione del perossido di idrogeno agendo attraverso l'ossidazione di glutazione ridotto (GSH) secondo la seguente reazione:

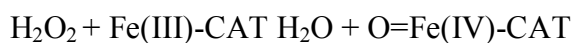


Un altro enzima coinvolto nella detossificazione di substrati ossidati è Glutatione-S-Transferasi (GST-transferasi) che catalizza la coniugazione del GSH direttamente ai substrati ossidati che vengono poi eliminati dall'organismo.

L'attività sia delle GPx che delle GST comporta un abbassamento del livello totale del GSH intracellulare

- Catalasi

La catalasi è un enzima tetramericco ad alto peso molecolare contenente porfirina nel sito attivo. La sua funzione principale è quella di eliminare il perossido di idrogeno (H₂O₂) ad elevate concentrazioni catalizzando la sua dismutazione ad ossigeno e acqua attraverso una reazione che avviene in due passaggi:



La reazione netta risultante è quindi: $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

1.3 b Antiossidanti non enzimatici o secondari

- Glutatione (GSH) tioli (-SH) totali

Il Glutatione (GSH) di natura peptidica (glu-cys-gly) è il più importante antiossidante tiolico solubile all'interno della cellula e partecipa con vari meccanismi alla difesa cellulare dagli agenti endogeni ed esogeni nocivi.

È il regolatore più importante dell'equilibrio ossidativo intracellulare ed è praticamente ubiquitario nell'organismo, ma è particolarmente abbondante nel fegato dove raggiunge concentrazioni pari o superiori a 5 mM. A livello intracellulare, la sua concentrazione è molto elevata nel citosol (1-11 mM), nei nuclei (3-15 mM) e nei mitocondri (5-11 mM), nei quali rappresenta il più importante antiossidante solubile. Oltre al GSH hanno potere antiossidante tutti i tioli come omocistetina cisteilglicina e i tioli proteici. Il loro potere

antiossidante deriva dalla capacità del gruppo -SH del residuo cisteinico di donare facilmente un elettrone. E' cofattore di numerosi enzimi come la GPx e la GST coniugandosi con composti sia endogeni che esogeni. E' inoltre in grado di agire da scavenger nei confronti di HO• e $1O_2$ e di detossificare H_2O_2 e i perossidi lipidici e ripristina la forma ridotta di importanti antiossidanti come la vitamina C ed E (Valko et al., 2006). Attraverso l'azione delle Glutathione S-transferasi (GSTs), esso interviene nella neutralizzazione di composti elettrofili impedendone gli effetti citotossici.

- Altri antiossidanti non enzimatici.

La vitamina C (acido ascorbico), la vitamina E (tocotrienoli α , β , γ e δ e tocoferoli α , β , γ e δ) e la vitamina A sono considerati potenti antiossidanti non enzimatici. Alcuni studi hanno messo in evidenza la presenza nel plasma seminale di sostanze come l'ergotioneina e la glicerilfosforilcolina, che si sono dimostrate in grado di ridurre la lipoperossidazione (Nield et al., 2005). Anche l'albumina è una proteina extracellulare ad azione antiossidante in grado di legare gli ioni Fe^{2+} e Cu^+ riducendo la formazione dell'anione perossido (Kalifa e Waheed, 2006). La taurina è considerata una molecola importante per la motilità e la fertilità spermatica e gioca un ruolo di rilievo anche nella regolazione osmotica e nell'equilibrio ionico (Michael *et al.*, 2007). L'acido piruvico è un potente scavenger del perossido d'idrogeno e aggiunto nel seme bovino diluito con tuorlo d'uovo e congelato o diluito con diluitori a base di latte e refrigerato, ha migliorato i valori della motilità e del contenuto di ATP (Khalifa e Waheed, 2006).

1.4 STRESS OSSIDATIVO

Le specie ossidanti sono prodotti della normale attività metabolica che, a concentrazione fisiologica, svolgono importantissime funzioni a livello cellulare e sistemico.

I metaboliti ossidanti di maggiore interesse biologico sono centrati su pochi elementi: ossigeno, azoto, carbonio, cloro, zolfo (Celino *et al.*, 2011). L'espressione stress ossidativo è stata introdotta per la prima volta nel 1989 da Sies che lo definì come *uno squilibrio tra la produzione di specie radicaliche dell'ossigeno (ROS) e i sistemi di difesa antiossidanti*. Il termine stress ossidativo identifica dunque una condizione patologica causata dalla rottura del fisiologico equilibrio fra la produzione e l'eliminazione di specie chimiche ossidanti (Celino *et al.*, 2011).

In condizioni fisiologiche la cellula mantiene uno equilibrio grazie ad un sistema di enzimi e molecole che controbilanciano la produzione di ROS. Se la quantità di ROS supera quella antiossidante della cellula, si viene ad instaurare una nuova condizione che prende appunto il nome di stress ossidativo (Turner e Lysiak, 2008). Lo stato di stress induce una cascata endocrina come parte della risposta non specifica che agisce sia a livello neuronale sia a livello ormonale sull'asse ipotalamo-ipofisario (Kobayashi *et al.*, 2009). Si assiste a un cambiamento degli ormoni circolanti come risposta secondaria al fattore di stress, unitamente a cambiamenti nello stato osmotico, di sviluppo, di capacità immunitaria e di biosintesi dell'energia che portano a modificare la capacità riproduttiva. Lo stress ossidativo quindi è dato da un aumento dei ROS, i quali essendo molto reattivi, reagiscono a vari livelli riuscendo ad ossidare:

- le catene idrocarburiche degli acidi grassi insaturi : perossidazione dei lipidi (Zhonghua *et al.*, 2011) che induce un aumento della rigidità delle membrane cellulari (Fig. 5), le quali perdono fluidità e permeabilità selettiva (Spiteller, 2006).

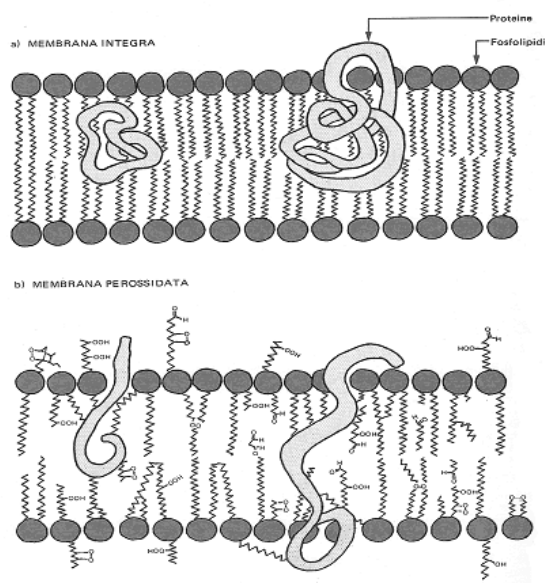


Figura 5. Modificazioni della membrana cellulare a seguito della per ossidazione lipidica

Si instaura una serie di reazioni a catena composta da tre fasi: iniziazione, propagazione e terminazione (Fig.6) in cui gli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana si trasformano progressivamente in radicali lipidici ($L\bullet$), radicali perossidi ($LOO\bullet$) e perossidi lipidici ($LOOH$). Questi ultimi possono decomporsi facilmente in diverse specie quali alcossidi lipidici ($LO\bullet$), aldeidi (malondialdeide, MDA), alcani, epossidi lipidici e alcool.

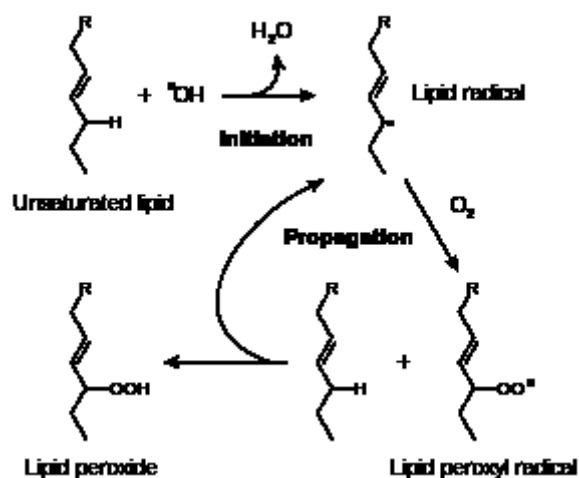


Figura 6. Fasi del processo di perossidazione lipidica e sua inibizione

Durante la fase di iniziazione si ha il distacco, per azione di un radicale libero ($\text{ROO}\bullet$), di un atomo di idrogeno allilico dal gruppo metilenico coniugato ad un doppio legame nella catena dell'acido grasso insaturo (LH), con conseguente formazione di un radicale ($\text{L}\bullet$) sull'atomo di carbonio corrispondente; nello stadio di propagazione, i radicali $\text{L}\bullet$ reagiscono molto velocemente con l'ossigeno molecolare, generando i radicali perossidici $\text{LOO}\bullet$ che a loro volta sottraggono un atomo di idrogeno ad un'altra molecola di acido grasso insaturo per formare un idroperossido (LOOH) e un altro radicale $\text{L}\bullet$.

Le reazioni di propagazione portano alla formazione di una catena cinetica, in cui per ogni radicale $\text{ROO}\bullet$ generato vengono consumate più molecole di LH e per ogni molecola di LH che reagisce scompare una molecola di ossigeno. In fase di terminazione, i radicali liberi prodotti durante il processo reagiscono tra loro e danno origine a prodotti non radicalici, inattivi.

- i residui amminoacidici delle proteine : l'azione dei ROS altera completamente le proprietà chimico-fisiche caratteristiche della proteina stessa. Si modifica il punto isoelettrico per reazioni di carbossilazione che causano ossidazioni dei gruppi -R degli amminoacidi (Davies *et al.*, 1987) ed il peso molecolare per formazione di legami intramolecolari o alla scissione della proteina in frammenti peptidici (Salo *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1986). Questi cambiamenti provocano l'attivazione di specifici enzimi proteolitici e conseguente degradazione della proteina (Dean *et al.*, 1993). Tra le proteine enzimatiche, che per prime risentono dell'attacco dei radicali liberi e che quindi si denaturano, sono da ricordare la fosfofruttochinasi I (enzima chiave della via glicolitica) e il complesso I della catena respiratoria. L'inattivazione di questi due enzimi porta ad una riduzione del metabolismo energetico cellulare.
- i carboidrati e le basi azotate degli acidi nucleici : le alterazioni ossidative inibiscono irreversibilmente i processi di trascrizione, traduzione e replicazione del DNA portando alla

morte cellulare (Celino *et al.*, 2011). Il danno ossidativo a carico del DNA può portare alla rottura dei filamenti, formazione di legami crociati DNA-DNA o DNA-proteine, scambio dei cromatidi fratelli, modificazione delle basi azotate. Nei casi più gravi, i ROS alterano, compromettendola, la funzione di tutte le strutture e le macromolecole cellulari con conseguente morte cellulare (Uttara *et al.*, 2009).

1.4 a SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

Senza l'ossigeno gli organismi aerobi non potrebbero sopravvivere. Esso però presenta una struttura atomica che non gli permette di accettare doppietti elettronici e per questo motivo può generare intermedi altamente instabili noti come specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Fujii e Tsunoda, 2011). Queste specie sono il risultato di successive reazioni fino alla completa riduzione dell'ossigeno ad H₂O e possono essere suddivise in due categorie:

- radicali liberi dell'ossigeno (ad es. O₂⁻ e OH), che contengono un elettrone spaiato;
- specie non radicaliche (ad es. H₂O₂).

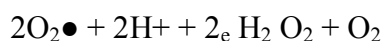
Diverse specie chimiche reattive sono implicate nella patogenesi dello **STRESS OSSIDATIVO**

Specie chimica	Formula	Classe	Specie chimica	Formula	Classe
Ozono	O ₃	Non radicale	Ossido nitrico	NO [•]	Radicale
Anione superossido	O ₂ ^{•-}	Radicale	Acido nitroso	HNO ₂	Non radicale
Ossigeno singoletto	¹ O ₂ [•]	Radicale (?)	Tetrossido nitrico	N ₂ O ₄	Non radicale
Perossido di idrogeno	H ₂ O ₂	Non radicale	Triossido nitrico	N ₂ O ₃	Non radicale
Radicale ossidrilico	HO [•]	Radicale	Perossinitrito	ONOO [•]	Non radicale
Radicale alchilico	R [•]	Radicale	Acido perossinitroso	ONOOH	Non radicale
(Alchil-)perossil radicale	ROO [•]	Radicale	Catione nitronio	NO ₂ ⁺	Non radicale
(Alchil)idroperossido	ROOH	Non radicale	(Alchil)perossinitrito	ROONO	Non radicale
Semichinone (dal Coenz. Q)	Q [•]	Radicale	Acido ipocloroso	HOCLO	Non radicale
Fenossile (dalla vitamina E)	E-O [•]	Radicale	Tiile	-S [•]	Radicale

- Anione superossido

L'anione superossido ha un'emivita relativamente lunga ed è capace di attaccare un ampio numero di substrati. Esso si può formare per interazione dell'O₂ con gli elettroni della catena respiratoria; nel corso di ossidazioni metallo-dipendenti di molecole come l'adrenalina e la noradrenalina o anche per produzione diretta in reazioni enzimatiche catalizzate dalle xantine ossidasi, triptofano diossigenasi e indolamine diossigenasi.

La dismutazione dell'anione superossido spontanea o catalizzata dall'enzima *Superossido Dismutasi* (SOD) rappresenta la maggiore fonte di perossido di idrogeno nella cellula.



- Perossido di idrogeno

Il perossido di idrogeno (H₂O₂) è relativamente stabile, con un'emivita intracellulare piuttosto lunga. Si può formare sia per dismutazione dell'anione superossido che per produzione diretta in alcune reazioni enzimatiche a livello dei microsomi, perossisomi e mitocondri. Risulta essere citotossico essendo in grado di dare origine al radicale idrossile attraverso delle reazioni catalizzate da ioni metallici.



- 4.1.c Radicale idrossilico

Il radicale idrossile OH• è una molecola altamente reattiva con forti capacità ossidanti e costituisce l'agente responsabile della fase iniziale dei processi perossidativi nei tessuti animali. È in grado di danneggiare proteine, acidi nucleici, glicosaminoglicani e soprattutto gli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana.

- Ossigeno singoletto ¹O₂

L'ossigeno singoletto è una forma altamente reattiva di ossigeno. In vitro è capace di ossidare la maggior parte delle molecole organiche. L'azione della NADPH ossidasi

produce il radicale anione superossido che, spontaneamente o enzimaticamente, dismuta per formare perossido di idrogeno.

La mieloperossidasi dei macrofagi o attività perossidasiche correlate, catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno per formare l'ossidante acido ipocloroso. L'acido ipocloroso e H_2O_2 reagiscono per formare l'ossigeno singoletto.

1.5 STRESS OSSIDATIVO DEL TESTICOLO

È ormai noto che gli spermatozoi così come le membrane testicolari, sono altamente ricchi di acidi grassi polinsaturi e quindi particolarmente esposti agli effetti deleteri delle specie ossigeno reattive e, di fatto, molti dei danni indotti da queste ultime sono il risultato del processo di perossidazione lipidica che causa anomalie nel tratto intermedio e nella motilità (Imai e Nakagawa, 2003). Durante la spermatogenesi si producono i ROS, si riduce il glutatione intracellulare e numerose proteine tioliche sono ossidate a bisolfuri (Puglisi *et al.*, 2005).

La produzione di specie ossigeno reattive e l'esaurimento di glutatione nelle cellule germinali maschili di vertebrati sono eventi fisiologici richiesti per la maturazione funzionale e la capacitazione degli spermatozoi. A basse concentrazioni, il perossido d'idrogeno può promuovere *in vitro* la capacitazione degli spermatozoi, sebbene concentrazioni più alte risultino tossiche (Drevet *et al.*, 2006). La spermatogenesi è caratterizzata da una notevole divisione cellulare che richiede un alto consumo di ossigeno mitocondriale a carico dell'epitelio germinale con elevata produzione di ROS.

Per questo i testicoli sono muniti di un sofisticato sistema antiossidante che vede il suo maggiore rappresentante nella SOD della quale contiene non solo le forme convenzionali (Cu/Zn e Fe/Mn) ma anche una forma insolita extracellulare (SOD-Ex) che è prodotta sia dalle cellule germinali che dalle cellule del Sertoli.

Lo status antiossidante del testicolo può essere distrutto dalla concomitanza di patologie sia a carico dell'organo stesso (da una criptorchidismo, torsione) che di altri organi (ipertiroidismo, squilibri endocrini). Si deduce quindi che lo stress ossidativo è la principale causa nell'eziologia dell'infertilità maschile. A livello degli spermatozoi i ROS inducono il sistema bifasico di perossidazione lipidica e di frammentazione del DNA (Aitken et al., 2007); a livello del testicolo lo stress ossidativo è “distruttore” sia della capacità steroidogenica delle cellule del Leydig che dell'epitelio germinale di differenziare gli spermatozoi (Naughton et al., 2001). La produzione controllata di ROS da parte degli spermatozoi ha una funzione di controllo e di mediatore di eventi fisiologici come la capacitazione, la reazione acrosomiale e la fusione oocita-spermatozoo (Almeida e Ball, 2005; Neild et al., 2005; Golas et al., 2010; Bailey et al., 2000); l'ossidazione dei gruppi SH (tioli) delle proteine è stata associata all'inibizione della motilità e della capacità fecondante (fusione delle membrane e penetrazione nell'oocita) (Khalifa e Waheed, 2006; Bailey et al., 2000).

1.6 STRESS OSSIDATIVO NELL'OVAIO

L'importanza dell'azione protettiva data dagli antiossidanti nei confronti delle molecole di ROS generate durante la riduzione dell'ossigeno si ravvisa anche a livello ovarico essendo stati i ROS identificati anche negli embrioni e nei fluidi follicolari e oviduttali.

I radicali liberi hanno un ruolo fondamentale nell'intero processo delle funzionalità riproduttive fisiologiche e, in particolare, sono direttamente coinvolte nella maturazione dell'ovocita nella steroidogenesi, nell'attività del corpo luteo e, di conseguenza, nei processi di fecondazione, sviluppo embrionale e mantenimento della gravidanza.

Come si evince dalla letteratura scientifica, studi condotti nella donna hanno dimostrato che danni dovuti all'aumento dei livelli di ROS sono direttamente coinvolti nell'invecchiamento ovarico (Tarin *et al.* 1996). Fra le strutture cellulari maggiormente coinvolte nel processo riproduttivo, vi sono sicuramente i mitocondri (sede primaria della produzione di ROS) in quanto il loro stato funzionale influenza la qualità dell'ovocita e contribuisce ai processi di fecondazione e di sviluppo embrionale (Dumollard *et al.* 2007).

In particolare, è stato osservato che gli ovociti invecchiati contengono meno ATP (Van Blerkom *et al.* 1998) e hanno mitocondri con difetti morfologici, genetici e funzionali, tra cui un minor potenziale elettrico a livello della membrana interna ($\Delta\psi$) (Wilding *et al.* 2001) e più alti livelli di mutazioni puntiformi e di riarrangiamenti del DNA (Eichenlaub-Ritter *et al.* 2010).

L'accumulo di stress ossidativo generato dall'ovocita e/o dalle cellule somatiche che lo circondano compromette la vitalità e la competenza dell'ovocita e conseguentemente dell'embrione, determinando una diminuzione delle percentuali di gravidanza (Rashidi *et al.* 2009). Da studi effettuati sui topi, la somministrazione di antiossidanti per via orale in soggetti invecchiati è effettivamente in grado di contrastare gli effetti negativi dell'invecchiamento sulla qualità degli ovociti mentre gli stessi trattamenti danneggiano la fertilità di topi giovani (Tarin *et al.* 2002).

Come per tutti gli altri sistemi biologici, l'invecchiamento ovarico sembra quindi essere associato sia ad una diminuzione di antiossidanti sia ad un aumento della produzione di tra cui un ruolo cruciale è ricoperto dall'apoptosi delle cellule della granulosa (Moffatt *et al.* 2002). L'invecchiamento dell'ovocita è caratterizzato da una sequenza di processi cellulari e molecolari che inficiano la successiva fecondazione e lo sviluppo embrionale.

Strutturalmente le modificazioni sono a carico della membrana plasmatica, del citoscheletro e della struttura del fuso meiotico con conseguente prematura e ineguale separazione dei cromosomi. Infine, sono state messe in evidenza la diminuzione del potenziale di membrana dei mitocondri e la degenerazione del gobulo polare (Miao *et al.* 2009).

2. SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare le concentrazioni di antiossidanti presenti nel seme e nel liquido follicolare di specie di animali domestici, attuando un monitoraggio in diversi periodi dell'anno, al fine di stabilire con più precisione dei periodi temporali in cui lo stato degli antiossidanti è più favorevole alla capacità fecondante del gamete.

In considerazione del fatto che il liquido follicolare di suino rappresenta parte integrante e imprescindibile della composizione del medium di maturazione degli oociti di suino, lo studio si è concentrato sul dosaggio degli antiossidanti e conseguente stress ossidativo, all'interno di questa sostanza così importante per la maturazione in vitro (IVM) degli oociti di questa specie animale.

L'IVM degli oociti di suino infatti, presenta non poche difficoltà, in considerazione delle particolarità fisiologiche della specie.

Attraverso il presente studio si è cercato dunque di capire se esistono dei periodi dell'anno in cui la concentrazione degli antiossidanti contenuti all'interno del liquido follicolare è maggiormente favorevole in considerazione del liquido stesso come componente del medium di maturazione.

Il medium di maturazione utilizzato è stato l'NCSU-37, scelto in base alle informazioni ottenute dalla letteratura (Peters and Wells, 1993) e ad una personale esperienza svolta in laboratorio. Per l'IVM il medium veniva supplementato con β -mercaptoetanolo, L-Cisteina, insulina, dbAMPc e liquido follicolare suino (PFF) così come mostrato dalla tabella 2 (Funahashi *et al.* 1997).

A questo punto la domanda che ci si è posti è stata: esiste una differenza nello stato ossidativo del liquido follicolare prelevato nei diversi periodi dell'anno? E soprattutto, se esiste, può influenzare in qualche modo il successo nella maturazione degli oociti ed eventualmente la loro conseguente fecondazione in vitro?

Anche per quanto riguarda il seme, si è voluto capire se esistono delle differenze nelle quantità e nelle varie categorie di antiossidanti e, come per il liquido follicolare, l'obiettivo è stato quello di individuare eventuali periodi in cui l'utilizzo del seme in laboratorio può essere maggiormente favorevole ad una conseguente fertilizzazione o crioconservazione.

Per conseguire questo obiettivo è stato studiato il seme di ariete, come rappresentante di una specie stagionale, e di verro, come rappresentante di una specie a ciclo continuo.

Questo studio può consentire infatti di concentrare parti del lavoro di chi si occupa di riproduzione, in periodi dell'anno in cui lo stato ossidativo, non influisce negativamente sui risultati ottenibili, con conseguente ottimizzazione di tempo e risorse economiche.

In una idea di progetto futuristico, si potrebbe pensare di indagare, partendo dal presente studio, anche sui diversi tipi di antiossidanti maggiormente presenti nei periodi in cui i dosaggi hanno mostrato una capacità antiossidante migliore, per poter eventualmente addizionarli al seme o al liquido follicolare nei periodi ritenuti decisamente peggiori dal punto di vista delle qualità antiossidanti.

Il lavoro si è articolato in tre fasi:

Fase 1: Monitoraggio degli antiossidanti e stress ossidativo nel materiale seminale.

Le specie studiate sono state l'ariete e il verro , tenendo conto dunque delle differenze fondamentali tra specie stagionali con fotoperiodo negativo (ariete) e specie a riproduzione annuale continua (verro)

Fase 2 : Monitoraggio degli antiossidanti e stress ossidativo nel liquido follicolare.

È stato analizzato il liquido follicolare di suino effettuando analisi con cadenza mensile.

Fase 3: sperimentazioni sul liquido follicolare di suino e prove di maturazione e fecondazione in vitro.

3. MATERIALI E METODI

Tutti i prodotti chimici utilizzati nella presente tesi sono stati acquistati dalla ditta Sigma-Aldrich (Chemical Co. St louis, MO, USA), in caso contrario la provenienza del prodotto verrà specificata.

3.1 SEME

3.1 a Prelievo del materiale seminale e valutazione della funzionalità spermatica sul seme fresco.

Arieti

Per il prelievo del materiale seminale sono stati utilizzati due arieti di razza sarda (Fig. 6.2) di proprietà del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari, di età compresa tra cinque e otto anni tenuti in ambiente costante durante tutto l'anno, alimentati con fieno di prato stabile con un'integrazione di un concentrato commerciale. Gli arieti sono entrambi fertili e addestrati al salto in vagina artificiale.



Figura 7. Ariete di Razza Sarda

Verro

Per il prelievo del materiale seminale è stato utilizzato un verro di ibrido commerciale di proprietà del Dipartimento di Medicina Veterinaria di Sassari, dell'età di sette anni tenuto in ambiente costante durante tutto l'anno, alimentato con mangime commerciale. Il verro è stato addestrato al salto su manichino e prelievo con metodo della mano guantata. (Fig. 6.3)



Figura 8. Salto di verro su manichino

3.1. b Vitalità spermatica

La colorazione per la vitalità prevede l'utilizzo di un colorante, l'eosina nigrosina, in grado di identificare le cellule spermatiche morte e quelle con soluzioni di continuo a livello della membrana che riveste il cappuccio acrosomiale. La vitalità, intesa come rapporto cellule vive/morte, è stata valutata mediante colorazione col colorante suddetto che, non passando le membrane delle cellule ancora vitali, colora in rosa solo gli spermatozoi morti, mentre la bassa permeabilità degli spermatozoi vivi impedisce la penetrazione dell'eosina e perciò mantiene la colorazione biancastra della testa. La presenza della nigrosina assicura un adeguato contrasto del preparato (Chalah e Brilland, 1998).

Per procedere all'analisi 1µl del materiale seminale è stato sospeso in 200/400 µl di PBS per ottenere una concentrazione di 25×10^6 spermatozoi/ml; 5 µl di questa soluzione sono stati addizionati a 10 µl di eosina-nigrosina, depositati su un vetrino, lasciati a miscelare per 30 secondi, strisciati con un coprioggetto e fatti asciugare per 10 minuti. Ogni campione è stato analizzato in doppio contando al microscopio Diaphon (Nikon) almeno 200 spermatozoi per ogni vetrino.



Figura 9 Esempio di spermatozoi colorati con eosina-nigrosina.

3.1. c Motilità spermatica

Un'altra aliquota della diluizione preparata per la vitalità è stata destinata alla valutazione della motilità mediante analisi computerizzata (CASA). Dieci microlitri di campione diluito sono stati quindi posizionati in una camera di Makler su un microscopio con piano riscaldato a 38°C e la motilità spermatica analizzata da un analizzatore di motilità computerizzato (CASA, Computer Assisted Sperm Analysis, v 3.2.0 Microptics S.L., Barcellona, Spagna) (Fig. 6.1.2).

Sono stati analizzati 5 campi (200 spermatozoi per campo) per campione. I parametri della motilità presi in esame sono stati i motili progressivi e i rapidi.

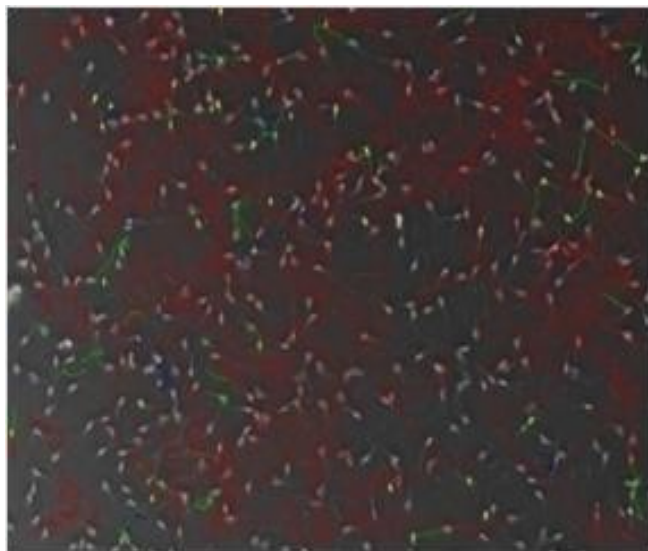


Figura 10. Esempio di schermata CASA

3.1.d Estrazione e dosaggio dell'ATP intracellulare nel seme

La misurazione di ATP è stata effettuata tramite Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer, con metodo enzimatico, ad una lunghezza d'onda di 340 nm (Bergmeyer, 1974). Il dosaggio enzimatico è stato effettuato a 37°C usando la coppia di enzimi G6PD e HK. L'estratto perclorico (25µl), contenente ATP in quantità incognita, è stato addizionato a 400 µl di buffer TRAP (0.1 mol/L, pH 7.6); alla mistura sono stati inoltre aggiunti 2 µl di G6PD (1 mg/ml), 8 µl di glucosio (18 mg/ml), 8 µl di nicotinamide adenin dinucleotide fosfato (NADP⁺) (20 mg/ml) e 8 µl di MgCl₂ (66 mg/ml).

Infine la reazione è stata innescata con l'aggiunta di 2 µl di HK (2 mg/ml). Con l'aggiunta di HK l'ATP del campione viene defosforilato e si trasforma in G6P, che con il NADPH diventa substrato del G6PD per produrre NADPH. Quest'ultimo viene misurato a 340 nm ed è proporzionale alla concentrazione di ATP. La concentrazione di ATP, espressa in µM, viene calcolata sulla base di una curva standard e normalizzata per numero di spermatozoi. La concentrazione finale viene quindi espressa come nanomoliATP/10⁹ spermatozoi.

3.1. e. Plasma ed estratto cellulare

I campioni di seme non diluito sono stati sottoposti a centrifugazione a 4000 rpm per 10 minuti (nel caso del seme di verro) ed a 10000 rpm per 3 minuti (per il seme di ariete e becco).

Alla fine del tempo di centrifugazione è stato recuperato il surnatante (Plasma seminale) e stoccato in congelatore a -80°C per le successive analisi. Il sedimento è stato invece addizionato a Triton 0.1%, vortexato e lasciato in ghiaccio per cinque minuti. Terminata la sosta in ghiaccio, il campione è stato centrifugato agli stessi rpm e per gli stessi minuti indicati sopra, dopodiché è stato recuperato il surnatante rappresentante l'estratto cellulare e stoccato in congelatore a -80°C fino al momento delle analisi.

3.2 Ovaie ed oociti

3.2 a Raccolta e classificazione delle ovaie

Le ovaie sono state prelevate in sede di macellazione, nei mattatoi di Ploaghe (SS) Le ovaie di suino provenivano sempre da scrofette prepuberi di ibridi commerciali dello stesso allevamento e venivano preventivamente sottoposte a visita veterinaria ante-mortem, in accordo con la normativa vigente (89/5567ECC e successive modifiche).

Una volta prelevate, le ovaie venivano immerse in PBS, una soluzione salina tamponata (PBS, Sigma) addizionata ad antibiotici (penicillina e streptomicina 5 mg/100ml), e trasportate in laboratorio entro un'ora alla temperatura di 37°C.

3.2. b Analisi macroscopica delle ovaie

Le ovaie delle scofette che venivano scelte per essere trasportate in laboratorio erano preferibilmente prive di corpi lutei e con follicoli di dimensioni maggiori a 3 millimetri di diametro.



Figura 10: esempio di ovaia scelta per il lavoro

3.2.c Prelievo liquido follicolare

Una volta giunte in laboratorio, le ovaie venivano lavate almeno due volte in PBS e il contenuto dei follicoli raccolto con siringa da 10 mL sulla quale era stato montato un ago da 18 gauge. Il liquido follicolare veniva dunque raccolto nelle eppendorf e fatto centrifugare a 4000 rpm per 30 minuti, a 4°C.

Al termine della centrifugazione, veniva raccolto il surnatante che rappresentava il liquido follicolare privo di componenti cellulari. La fase successiva riguardava lo stoccaggio del campione in congelatore a -80°C per l'esecuzione delle successive analisi.

3.2.d Prelievo di oociti di suino

Le ovaie scelte appartenevano a scofette prepuberi e non presentavano corpi lutei. Da quanto si evince dalla letteratura infatti, gli oociti provenienti da ovaie di scrofe o scrofette con corpi lutei, presentano una qualità sensibilmente inferiore. I complessi ovocita-cumulo ooforo (COC), sono stati aspirati dall'ovaio secondo il seguente protocollo. Il contenuto di ogni follicolo è stato aspirato in provette a fondo conico da 15 ml mediante aspirazione, come descritto nella metodica di prelievo del liquido follicolare. Una volta raccolto nelle eppendorf il liquido follicolare, contenente gli oociti, veniva fatto sedimentare per circa 20 minuti a 37°C . Dopo la raccolta, i COC sono stati trasferiti in una piastra petri da 60 mm e selezionati utilizzando uno stereomicroscopio, dotato di piastra termostata regolata a 38°C . I COC sono stati selezionati seguendo i criteri morfologici comunemente accettati nelle pratiche di maturazione in vitro. In particolare sono stati utilizzati soltanto COC che presentavano un ovocita con citoplasma omogeneo e di colore marrone chiaro, circondati da cinque o più strati completi di cellule del cumulo. Al termine della selezione, i COC sono stati lavati due volte in 2 ml di medium NCSU-37. L'intera procedura è stata svolta in circa 30-45 minuti ad una temperatura compresa fra i $37-38^{\circ}\text{C}$.

Gli oociti sono stati selezionati in base ad alcuni parametri morfologici e strutturali quali: la compattezza complesso cumulo-ovocita, l'omogenea distribuzione dei lipidi nel citoplasma e il diametro cellulare. L'ovocita doveva infatti presentare una forma circolare, con citoplasma omogeneo, senza vacuolizzazioni e la zona pellucida intatta.

3.2.e Maturazione in vitro (IVM)

Gli oociti scelti, venivano lavati almeno tre volte in liquido di lavaggio e messi in coltura in medium di maturazione NCSU-37. Uno stock di questo medium, con i componenti mostrati nella tabella 1, veniva preparato in laboratorio, filtrato e conservato in condizioni sterili a temperatura di +4°C per due settimane.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.70
Glucosa	5.55
D-Sorbitol	12.00
Penicillin G sodic	0.18
Streptomycin Sulphate	39.00 UI/ml

Tabella 1: composizione del medium NCSU-37 .

Per l'IVM il medium veniva supplementato con cisteina, β-mercaptoetanololo, insulina, dbAMPc, liquido follicolare di suino (PFF), PMSG e HCG come descritto da Funahashi *et al.* (1997) e mostrato nella tabella 2.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE (mM)
Cisteina	0.57mM
β -mercaptoethaolo	50.00 μ M
Insulina	5.00 mg/mL
dbAMPc	1.00 mM
PFF	10% (v/v)
PMSG	10 U.I./mL
HCG	10 U.I. /mL

Tabella 2: Composizione del medium NCSU-37 supplementato per la maturazione in vitro degli oociti di suino.

In ogni pozzetto contenente 500 μ L di medium, venivano sistemati 40 oociti, in piastre da quattro pozzetti (four-well dishes, NUNC, Roskilde, Danimarca) per 20-22 ore alla temperatura di 37 °C in atmosfera umidificata e addizionata del 5% di CO₂. Il liquido follicolare addizionato a ciascun pozzetto proveniva da mesi diversi dell'anno. Dopo 22-24 ore di incubazione a 37°C, gli oociti venivano lavati con nuovo medium di maturazione e trasferiti in nuovi pozzetti senza gli ormoni e l'AMPc e con nuovo PFF sempre in percentuale del 10%.

Alla 46ma ora dal momento della messa in coltura, gli oociti venivano denudati e sottoposti a fertilizzazione. Una volta maturati nei diversi liquidi follicolari analizzati e caratterizzati gli oociti sono stati sottoposti a diverse prove. Una parte degli oociti veniva fecondata, una parte determinato l'ATP, una parte sottoposta a colorazione e analisi confocale

3.2.f Estrazione e dosaggio dell'ATP negli oociti

20 oociti lavati con PBS e contenuti in un volume totale di 5 μ l di PBS, sono usati per l'estrazione e il dosaggio dell'ATP.

Per l'estrazione dell'ATP si eseguono i seguenti passaggi (Balestri F, et al. 2007)

- a. ai 5 μ l contenenti 20 oociti sono aggiunti 9 μ l di acido perclorico 0,6 M rigorosamente tutto in ghiaccio.
- b. Lasciare agire per 15 minuti in ghiaccio e in agitazione
- c. Centrifugare per 3 minuti a 10000 xg
- d. Raccogliere il sovrinatante
- e. Neutralizzare aggiungendo 1,35 μ l di 3,5M K_2CO_3
- f. Centrifugare per tre minuti
- g. Raccogliere il sovrinatante e effettuare il dosaggio.

Il dosaggio dell'ATP viene effettuato utilizzando l'elettroforesi capillare. Il campione viene derivatizzato e la derivatizzazione viene eseguita come descritto da Zinellu e al. (Zinellu A e al. 2010). Brevemente, 10 μ L di campione o standard vengono mescolati con 40 μ L di 1,8 mol / L di 1-etil-3-(3'-N, N'-dimetil-amminopropil)-carbodiimide (sciolto in 50 mM HEPES tampone, pH 6,5) e 5 μ L di 27 mmol / L Bodipy FL EDA (sciolto in 50 mM HEPES tampone, pH 6,5) e incubate per 25 ore a 37 °C al buio. Prima di effettuare le analisi su elettroforesi capillare, i campioni derivatizzati vengono diluiti in acqua 40 volte. L'elettroforesi capillare usata è AP / 5510 CE ACE, equipaggiata con Laser Induced Fluorescence (Beckman strumenti, CA, USA). La dimensione del capillare non patinato di silice fusa usato è di 75 μ m ID e 57 cm di lunghezza (50 cm per l'individuazione finestra).

L'analisi viene effettuata applicando ai 21 μ l di campione una pressione di azoto pari a 0,5 bar, per 3 s usando un tampone fosfato di sodio (10 mmol / L), pH 11,4. Le condizioni di separazione (22 kV a polarità normale) vengono raggiunte in 20 s e mantenute ad una tensione costante per 8 min. Tutte le separazioni vengono effettuate a 40 °C.

3.2.g Valutazione della funzionalità mitocondriale e dello stato ossidativo dell'oozita.

Gli oociti allo stadio di GV e di Metafase II (MII) sono stati sottoposti ad una colorazione elettiva basata sull'impiego di una sonda la 29,79 dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) e del colorante il Mito Tracker Red (MT-Red; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). La sonda H₂DCFDA emette una fluorescenza verde e il principio su cui si basa questa metodica può essere così sintetizzato: la sonda H₂DCFDA non ionizzata è permeabile alle membrane e quindi in grado di diffondere all'interno del citoplasma cellulare. All'interno della cellula, il gruppo acetato viene idrolizzato dalle esterasi intracellulari formando 29,79-diclorodihydrofluoresceina (H₂DCF), che è una molecola polare e quindi non in grado di attraversare la membrana cellulare. H₂DCF emette fluorescenza quando viene ossidata dalla H₂O₂ o dalle perossidasi lipidiche e forma 29,79-diclorofluoresceina (DCF). Il livello di DCF prodotta all'interno della cellula è direttamente proporzionale a quello dei perossidi presenti e quindi la sua emissione di fluorescenza fornisce una misurazione dello stato ossidativo cellulare (Nasr-Esfahani et al., 1990). Il MT-Red invece emette una fluorescenza rossa e marca solo i mitocondri attivi all'interno di cellule vive utilizzando il potenziale di membrana mitocondriale. Un volta che il MT-Red si accumula all'interno di questi organuli cellulari viene ossidato emettendo fluorescenza, consento così di evidenziare solo i mitocondri che sono specificatamente attivi e permettendo una valutazione quantitativa dell'attività dei questi organuli e una loro localizzazione spaziale all'interno della cellula.

Gli oociti allo stadio di GV e di MII venivano posti ad incubare in PBS contenente il 3% di bovine serum albumine (BSA) per 30 minuti a 39° C , al 5% CO₂ con il MT-Red alla concentrazione di 500 nM. Dopo incubazione gli oociti venivano lavati per tre volte in PBS 0,3% BSA e incubati per 20 minuti a 39° C , al 5% CO₂ e nello stesso medium contenente 10 μM di H₂DCFDA. Dopo incubazione gli oociti venivano lavati tre volte in PBS allo 0,1% PVA e fissati overnight a 4°C in glutaraldeide 2,5% in PBS. Infine gli oociti venivano montati su vetrino in una goccia contenente glicerolo e il colorante Hoechst 33342 (10μg/mL), che emette fluorescenza blu, per la visualizzazione dello stadio cromosomico ed analizzati ad ingrandimento 600x in immersione al microscopio confocale (Leica TCS SP5 CLSM). Per il MT-Red gli oociti venivano analizzati utilizzando una lunghezza d'onda di eccitazione di 579 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 599 nm, per la DCF veniva utilizzato una lunghezza d'onda di eccitazione di 495 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 519 nm. Ciascun oocita veniva esaminato lungo l'asse z mediante l'uso di circa 30 piani focali da un polo all'altro della cellula per garantire un'analisi tridimensionale. L'acquisizione, l'archiviazione e l'analisi delle immagini veniva effettuata utilizzando il programma LAS lite 170 Image software. In ogni singolo oocita l'intensità della fluorescenza emessa mediante MT-Red e DCF veniva misurata a livello del piano equatoriale della cellula come indicato da Dell'Aquila ME e coll.,(2014). La distribuzione del pattern mitocondriale veniva classificato in tre gruppi secondo De los Reyes e coll., 2011, con alcune modifiche: 1) FINE: distribuzione uniforme e diffusa di piccole granulazioni omogenee in tutto il citoplasma; 2) GRANULAR: distribuzione uniforme e granulata con granulazioni di maggiori dimensioni distribuite in tutto il citoplasma; 3) formazioni granulari eterogenee raggruppate a grappolo, distribuite in tutto il citoplasma o localizzati in particolari zone del citoplasma (pericorticali o perinucleari).

3.2.h Fertilizzazione omologa (IVF)

Una volta maturi e denudati dalle cellule della granulosa, gli oociti di suino venivano trasferiti in pozzetti contenenti il medium di fertilizzazione (Rath et al., 1999) la cui composizione è riportata nella tabella 3, e messi a fertilizzare con spermatozoi di verro provenienti da paillet crioconservate e preventivamente scongelate pochi minuti prima della fertilizzazione. Prima dell'aggiunta al pozzetto di fertilizzazione, il seme veniva sottoposto a 2 lavaggi in BTS e doppia centrifugazione a 2100 rpm per 5 minuti e conseguente misurazione della concentrazione spermatica allo spettrofotometro. Secondo l'assorbanza ottenuta e la sua comparazione con una curva standard del seme di suino, si aggiungeva al pozzetto contenente il liquido di fertilizzazione e gli oociti, una quantità di seme tale da avere una concentrazione finale di 1×10^6 spermatozoi per pozzetto.

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE (mM)
NaCl	114.06
NaHCO ₃	25.07
KCl	3.20
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	0.35
MgCl ₂ •6H ₂ O	0.50
Lactate Ca•5H ₂ O	8.00
Glucosa	5.00
Lactate sodic	10.00
Cafeine	2.00
Kanamycin sulphate	0.17
Phenol red	0.003
PVA	1mg/ml

Tabella 3: Composizione del medium di fertilizzazione TALP supplementato per la maturazione in vitro degli oociti di suino. Questo medium veniva preparato in laboratorio e dopo averlo filtrato, veniva conservato a temperature di +4°C e in condizioni sterili per due settimane.

I pozzetti contenenti oociti e spermatozoi venivano successivamente incubati a 37°C per 60 minuti. Al termine dell'ora di incubazione, gli oociti venivano accuratamente lavati dagli spermatozoi e trasferiti in nuovi pozzetti con medium di fertilizzazione, nel quale venivano lasciati a incubare per circa sei ore. terminate queste sei ore, gli oociti venivano ulteriormente trasferiti in nuovi pozzetti, questa volta con medium di coltura embrionale NCSU-23 (Peters and Wells, 1993), dove sostavano per 7 giorni in incubatore a 37°C. Anche il medium NCSU_23 veniva preparato in laboratorio, filtrato e mantenuto in condizioni sterili a +4°C per due settimane. (Vedi tabella 4)

COMPONENTE	CONCENTRAZIONE (mM)
NaCl	108.73
NaHCO ₃	25.07
KCl	4.78
KH ₂ PO ₄	1.19
MgSO ₄ •7H ₂ O	1.19
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.70
Glucosa	5.55
Taurine	7.00
Hipotaurine	5.00
Penicillin G sodique	0.18
Streptomycin sulphate	39 UI/ml

Tabella 4: Composizione del medium di coltura embrionale NCSU-23. Questo medium veniva preparato in laboratorio e dopo averlo filtrato, veniva conservato a temperature di +4°C e in condizioni sterili per due settimane.

3.2 Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale

Al termine del periodo di coltura, le blastocisti sono state fissate in metanolo al 60% in PBS e colorate con ioduro di propidio come descritto in letteratura (Luciano AM et al. 1999.) Dopo 186 ore dall'inizio della fecondazione sono state valutate, in ciascun gruppo sperimentale, la percentuale di embrioni che aveva raggiunto lo stadio di blastocisti. La qualità degli embrioni è stata quindi valutata attraverso la conta del numero dei nuclei, indicativi della quantità di blastomeri, mediante osservazione con microscopio rovesciato a fluorescenza, a 400 ingrandimenti.

3.3 Dosaggio dei parametri per valutare lo stato ossidativo del campione

I seguenti dosaggi sono stati effettuati nei diversi tipi di campione quali plasma seminale (ariete e suino), estratto cellulare del materiale seminale (ariete e suino) liquido follicolare (suino)

3.3.a Il d-Roms test dosaggio dei radicali liberi

Il d-ROMs test è un test spettrofotometrico che consente di determinare, in un campione biologico, la concentrazione degli idroperossidi (ROOH), generati nelle cellule dall'attacco ossidativo dei ROS su svariati substrati biochimici (glicidi, lipidi, amminoacidi, proteine, nucleotidi ecc.).

La sigla ROM vuole sottolineare che gli analiti misurati dal test, gli idroperossidi, sono dei metaboliti reattivi dell'ossigeno (Reactive Oxygen Metabolites, ROM). 50 μ l di campione (estratto cellulare, plasma seminale o liquido follicolare) sono aggiunti a 500 μ l di tampone sodio acetato 0,1 M, pH 4,8, contenente 1 μ l di FeSO₄ 9,5 mM, 10 μ l di N,N-diethyl-para-phenyldiamine (DEPPD). Nel tempo il DEPPD viene ossidato dagli idroperossidi presenti nel campione, colorandosi di rosa-rosso tale da essere quantificato a 505 nm. La lettura è stata effettuata ogni minuto allo spettrofotometro (Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer) per 6 minuti. Il valore di Δ Abs₅₀₅/min misurato nei sei minuti è stato moltiplicato per 10000 (conversione a unità CARR) per ottenere i valori in U-CARR che sono delle unità di concentrazione (dove 1 U CARR equivale a 0.08 mg H₂O₂/dL). I valori compresi tra 230-310 U-Carr erano considerati normali. Quando nel campione si superava tale rang di valori, la perossidazione era avanzata (A. Alberti et al. 2000). Valori superiori a 300 U CARR configurano, dopo una fascia borderline (301 - 320 U CARR), livelli progressivamente crescenti di stress ossidativo, come indicato in figura

Idroperossidi (U CARR)	Idroperossidi (mg H ₂ O ₂ /dL)	Stress ossidativo (gravità)
300-320	24.08-25.60	Condizione border-line
321-340	25.68-27.20	Stress ossidativo lieve
341-400	27.28-32.00	Stress ossidativo medio
401-500	32.08-40.00	Stress ossidativo elevato
>500	>40.00	Stress ossidativo elevatissimo
Range normale: 250-300 U CARR 1 U CARR corrisponde a 0.08 mg H ₂ O ₂ /dL		

3.3.b Determinazione della capacità antiossidante totale (TEAC)

La capacità antiossidante totale è stata determinata nell'estratto cellulare. Per la determinazione nell'estratto cellulare sul seme scongelato 500 μ L di campione sono stati

centrifugati a 7500 g e, dopo eliminazione del surnatante, addizionati ad un uguale volume di PBS con Triton 0,1% (500 µL), vortexati e lasciati 5 minuti in ghiaccio. In seguito sono stati centrifugati a 7500 g e il surnatante è stato stoccato nel freezer -80°C fino al momento del dosaggio. La capacità antiossidante totale nel plasma seminale e nell'estratto cellulare è stata determinata usando il metodo descritto da Re e altri, con delle modifiche secondo Lewinska e altri. In breve, una soluzione di ABTS⁺ è stata preparata sciogliendo 19,5 mg di 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) e 3,3 mg di potassio persolfato (Dipotassium peroxodisulphate) 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 1:550 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 alla lunghezza d'onda di 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 da 5-20 µM in un volume di reazione totale di 550 µL.

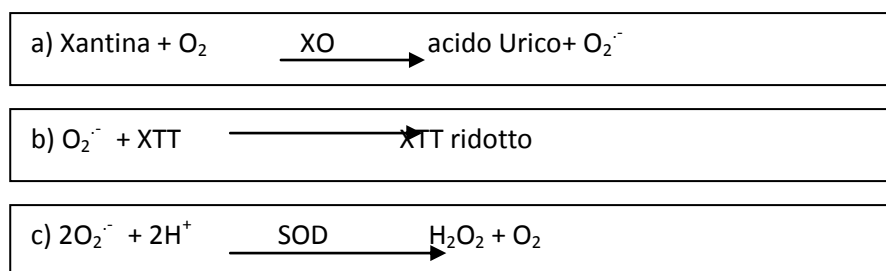
3.3.c. Dosaggio Malonildialdeide (MDA)

La malonildialdeide e i TBARS (prodotti della lipoperossidazione che reagiscono con l'acido tiobarbiturico) sono stati dosati usando il metodo spettrofotometrico di Spanier e Traylor (Spanier e Traylor 1991), a cui sono state apportate delle modifiche.

Il dosaggio prevede che a 100 μl di plasma o standard vengano aggiunti 100 μl di acido acetico glaciale diluito 1:3, 75 μl di SDS al 10% , 100 μl di tris-HCl 50mM pH 7,4 e 250 μl di TBA allo 0,75%. La miscela è stata poi incubata per 1 ora a 100°C e immediatamente raffreddata per 10 min in ghiaccio. Sono stati aggiunti in fine 200 μl di acido acetico e il tutto è stato centrifugato per 20 min a 14000 rpm. Il surnatante è stato poi letto con uno spettrofotometro Thermo Elocrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer, alla lunghezza d'onda di 535 nm. I valori di MDA nei campioni sono espressi in μM e calcolati utilizzando una curva standard da 2-30 μM di MDA.

3.3.d. Dosaggio della Superossido dismutasi (SOD)

L'attività enzimatica della SOD è stata misurata come decremento dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 470 nm dell'XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) ridotto dall'anione superossido generato dalla Xantina ossidasi, secondo la metodica di Ukeda e altri con qualche modifica (*Anal Biochem.* 1997 Sep). Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'--1--(phenylamino)-carbonyl--3, 4-tetrazolium]-bis(4-methoxy-6-nitro)benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. Lo schema riportato di seguito spiega come in presenza di SOD si instaura la competizione per l'anione superossido nella reazione b e c con la conseguente diminuzione della riduzione di XTT all'aumentare della concentrazione di SOD.



La reazione è condotta in un tampone sodio fosfato 40,5 mM a pH 7,8 a cui è aggiunta la Xantina 15 mM, l'EDTA 12,5 mM, l'XTT 30 mM e 20 µl di campione sino ad arrivare ad un volume finale di 1ml. La reazione parte con l'aggiunta alla miscela di reazione di xantina ossidasi; il cambiamento di assorbanza a 470 nm è stato monitorato per 3 minuti con uno spettrofotometro Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer. La curva standard è stata costruita usando SOD standard alla concentrazione di 0,065-0,8 U/ml. Una unità enzimatica è definita come la quantità di SOD capace di trasformare una mmole/min di O_2^- .

3.4. Disegno sperimentale

3.4.a 1° Esperimento: monitoraggio delle capacità antiossidanti del seme di ariete e verro nei diversi mesi dell'anno.

L'eiaculato pervenuto in laboratorio veniva mantenuto a temperatura costante e veniva sottoposto a diverse analisi per la valutazione di concentrazione del seme, motilità, vitalità e concentrazione di ATP. Una parte dell'eiaculato veniva usato per recuperare il plasma seminale ed effettuare l'estratto cellulare per i successivi dosaggi (test D-Roms, TEAC, MDA, SOD)

3.4.b 2° Esperimento: Monitoraggio delle capacità antiossidanti del liquido follicolare nei diversi mesi dell'anno.

Dopo l'aspirazione del liquido follicolare dai follicoli con dimensioni comprese tra 3 e 6 millimetri di diametro, secondo la tecnica già descritta nella sezione "materiali e metodi", si procedeva allo stoccaggio a -80°C per le successive analisi di dosaggio degli antiossidanti: Determinazione superossido dismutasi (SOD) Determinazione capacità antiossidante totale (TEAC) Dosaggio dei radicali liberi (TEST D-Roms) determinazione MalonildiAldeide (MDA)

3.4.c 3° Esperimento: Valutazione percentuali di maturazione degli oociti con liquidi follicolari prelevati in diversi mesi.

Gli oociti, prelevati di volta in volta, venivano suddivisi in gruppi secondo le stesse caratteristiche qualitative e messi a maturare con diversi liquidi follicolari.

Successivamente, al termine del processo di maturazione, ossia dopo 46 ore dalla messa in coltura, venivano fissati in PBS 40% e metanolo e colorati con propidio. Questo tipo di colorazione permetteva di osservare al microscopio a fluorescenza lo stadio di maturazione nucleare e valutarne dunque il raggiungimento dello stadio di metafase II.

3.4.d 4° Esperimento: Valutazione percentuale di fertilizzazione degli oociti maturi con liquidi follicolari prelevati in diversi mesi.

Gli oociti maturati con diversi liquidi follicolari, non destinati al fissaggio e colorazione con propidio, venivano messi a fertilizzare con seme scongelato di verro. Il seme proveniva per ogni prova dalla stessa paillette, per cui aveva le stesse caratteristiche per ogni gruppo di oociti. Prima di procedere alla fertilizzazione, si effettuava il lavaggio del seme e dunque alla sua preparazione per l'incontro con gli oociti. Questi erano stati precedentemente denudati dalle cellule della granulosa e lasciati immersi nel medium di maturazione all'interno dell'incubatore con umidità, pressione e temperatura controllate.

3.4.e 5° Esperimento: Valutazione dei parametri di sviluppo e qualità embrionale dopo utilizzo di diversi liquidi follicolari durante IVM

Gli embrioni ottenuti dai diversi gruppi di IVF, venivano sottoposti a procedure di controllo della qualità embrionale. Gli embrioni venivano infatti fissati dopo 48 ore dalla fertilizzazione, in 500 μ L di una soluzione di PBS 40% e metanolo e colorati con 5 μ L di propidio.

La piastra con gli embrioni veniva posta in frigo a temperature di 4°C e tenuta al buio per qualche ora. Gli embrioni venivano infine montati su un vetrino portaoggetti e osservati al microscopio a fluorescenza. In questo modo era possibile valutare lo stadio di sviluppo di ciascun embrione e il numero cellulare totale.

3.5.f 6° Esperimento Valutazione dell'attività mitocondriale e dello stato ossidativo degli oociti.

L'analisi dell'attività mitocondriale e dello stato ossidativo è stata condotta su un totale di 140 oociti così ripartiti:

- 26 oociti in stadio GV
- 27 oociti in stadi MII maturati con liquido follicolare di Giugno
- 39 oociti in stadi MII maturati con liquido follicolare di Aprile
- 25 oociti in stadi MII maturati con liquido follicolare di Luglio
- 23 oociti in stadi MII maturati con liquido follicolare di Marzo

3.5 Analisi statistica

I dati sulla vitalità, sulla motilità progressiva spermatica e sulla percentuale di spermatozoi rapidi, la determinazione della concentrazione intracellulare di ATP, sia su spermatozoi che oociti, il dosaggio della SOD, TEAC, Test D-Roms, MDA nel plasma seminale, nell'estratto cellulare e nel liquido follicolare, le percentuali di maturazione, fertilizzazione e produzione embrionale in vitro degli oociti di suino e l'analisi della funzionalità mitocondriale e dello stato ossidativo sono stati analizzati con ANOVA unidirezionale e sono espressi con la media \pm SD. L'analisi della distribuzione del pattern mitocondriale è stata effettuata mediante χ^2 test.

Le analisi statistiche sono state condotte usando il software di statistica Statgraphic Centurion XV (versione 15.02.06 per Windows; Stat Point, Inc., Herndon, VA, USA) e la probabilità di $P \leq 0,05$ è stata considerata come livello minimo di significatività.

4. RISULTATI

4.1 Risultati 1° esperimento

4.1.a Ariete

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da almeno due eiaculati mensili di due soggetti diversi. Poiché non sono state riscontrate differenze significative fra i due soggetti, le caratteristiche del seme possono essere riassunte nella tabella 5.

MESE	VIABILITY %	PROGRESSIVE MOTILE %	RAPID %
OTTOBRE	43,4783	42	54
NOVEMBRE	42,236	56	61
DICEMBRE	42,0655	55	69
GENNAIO	37,5	2	43
FEBBRAIO	42,9878	11	49
MARZO	44,7183	44	80
APRILE	48,0226	31	31
MAGGIO	70	47	53
GIUGNO	65,9864	71	67
LUGLIO	54,0107	41	48

Tabella 5: La tabella mostra che i parametri presi in considerazione ed elaborati dal programma informatico C.A.S.A. sono stati la vitalità, la percentuale di motili progressivi e la percentuale di rapidi. Per questi tre parametri, non sono state riscontrate differenze significative nel corso dei mesi dell'anno.

- **Determinazione SOD**

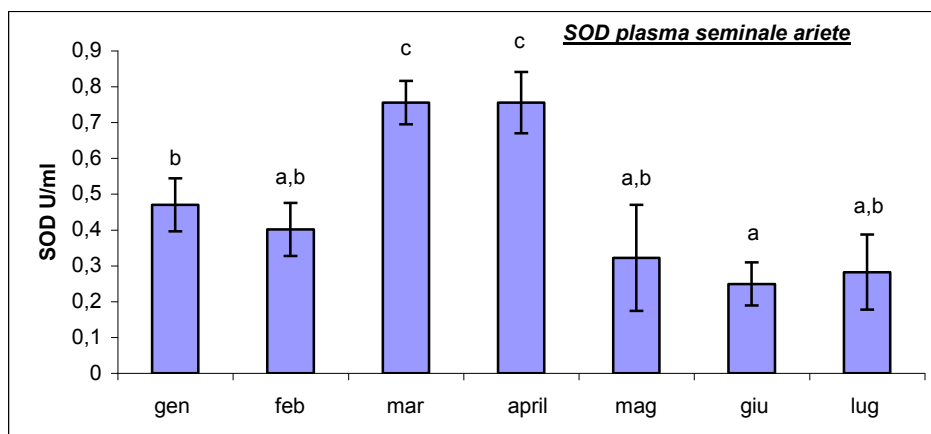


Grafico 1: Andamento della concentrazione dell'enzima superossido dismutasi (SOD) nel plasma seminale di ariete nel periodo annuale che va da gennaio a luglio. Le differenze sono risultate statisticamente significative ($p=0,0001$)

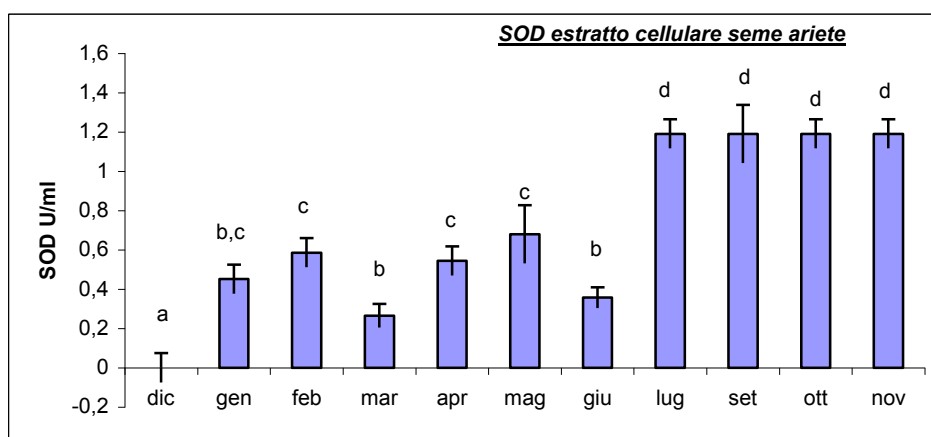


Grafico 2: Andamento della concentrazione dell'enzima superossido dismutasi (SOD) nell'estratto cellulare del seme di ariete nell'intero periodo annuale. Le differenze sono risultate statisticamente significative ($p=0,0001$)

- **Determinazione MDA**

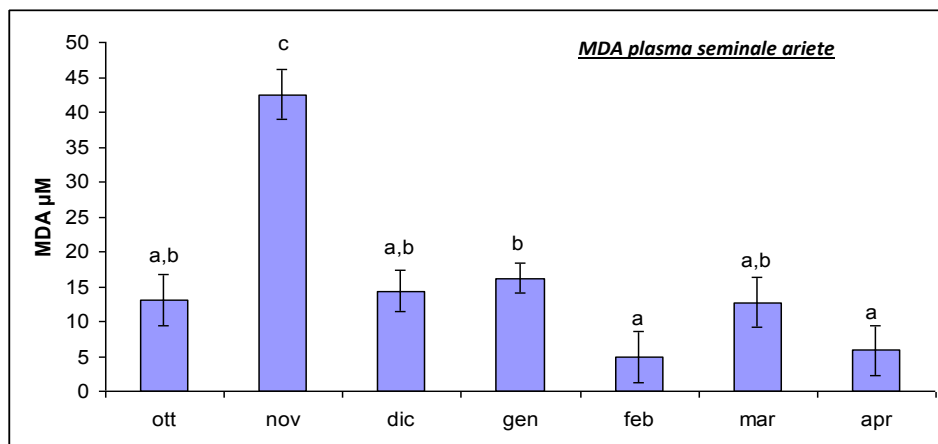


Grafico 3: Andamento della concentrazione della Manolildialdeide (MDA) nel plasma seminale di ariete nel periodo annuale che va da ottobre ad aprile.

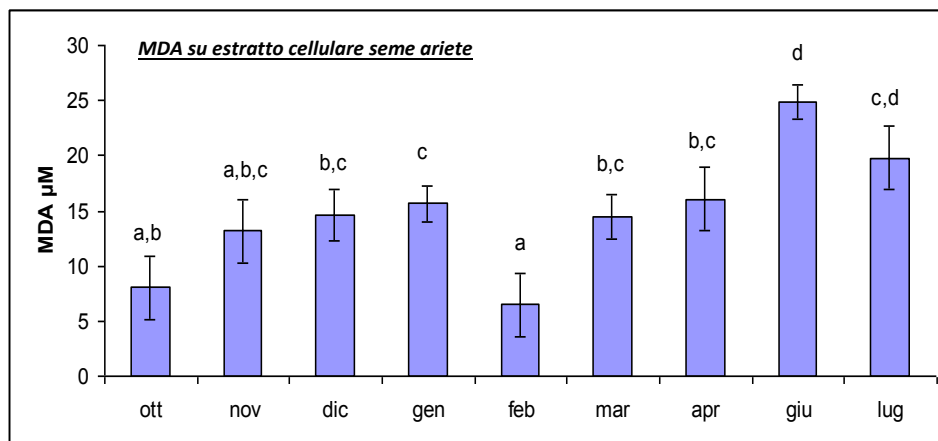


Grafico 4: Andamento della concentrazione della Manolildialdeide (MDA) nell'estratto cellulare del seme di ariete nel periodo annuale che va da ottobre ad aprile.

L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative sia nel plasma seminale ($p=0,0002$) che nell'estratto ($p=0,0002$).

- **Determinazione TEAC**

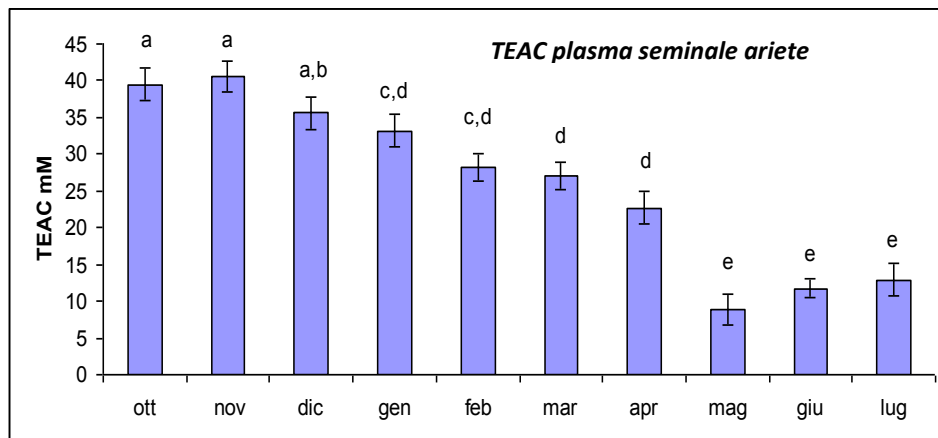


Grafico 5: Andamento della concentrazione della capacità antiossidante totale (TEAC) nel plasma seminale di ariete nel periodo annuale che va da ottobre luglio. Le differenze sono risultate statisticamente significative ($p=0,0000$)

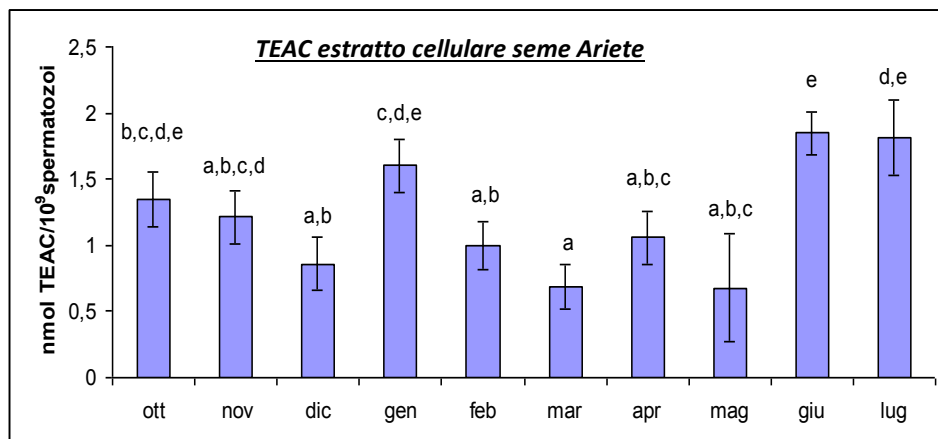


Grafico 6: Andamento della concentrazione della capacità antiossidante totale (TEAC) nell'estratto cellulare del seme di ariete nel periodo annuale che va da ottobre a luglio. Le differenze sono risultate statisticamente significative ($p=0,0009$)

- **Determinazione idroperossidi Test d-Roms.**

Il dosaggio degli idroperossidi mediante test d-Roms si è rivelato nullo per tutti i mesi dell'anno, sia nel plasma seminale sia nell'estratto cellulare.

- **Dosaggio ATP del seme di ariete**

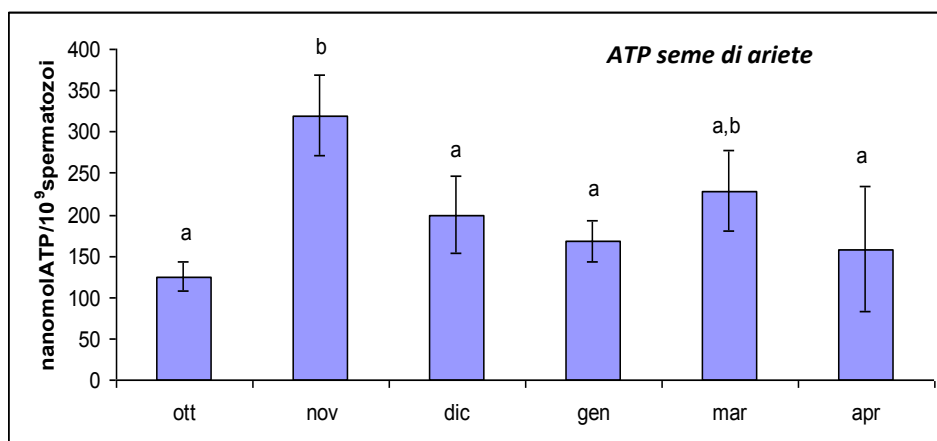


Grafico 7: Andamento della concentrazione dell'ATP nel seme di ariete nel periodo annuale che va da ottobre ad aprile. Le differenze sono risultate statisticamente significative.

4.1.b Verro

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da almeno due eiaculati mensili di un soggetto. Le caratteristiche del seme possono essere così riassunte:

MESE	VIABILITY (%)	PROGRESSIVE MOTILE %	RAPID %
SETTEMBRE	25±	17,7	25,8
OTTOBRE	14,7887	10,3	9,2
NOVEMBRE	56,6502	41,5	54,8
DICEMBRE	58,2677	50,6	42,3
GENNAIO	55,7292	0,02	23,3
FEBBRAIO	54,2945	53,7	63,3
MARZO	52	42,8	58,6

Tabella 6: La tabella mostra che i parametri presi in considerazione ed elaborati dal programma informatico C.A.S.A. sono stati la vitalità, la percentuale di motili progressivi e la percentuale di rapidi. Per questi tre parametri, non sono state riscontrate differenze significative nel corso dei mesi dell'anno.

La tabella mostra che i parametri presi in considerazione ed elaborati dal programma informatico C.A.S.A. sono stati la vitalità, la percentuale di motili progressivi e la percentuale di rapidi. Per questi tre parametri, non sono state riscontrate differenze significative nel corso dei mesi dell'anno.

Ciascun pool è stato sottoposto ad analisi spettrofotometriche per il dosaggio degli antiossidanti

- **Determinazione SOD**

Per quanto riguarda la determinazione della SOD presente nel plasma seminale non sono state evidenziate differenze statisticamente significative nei mesi presi in considerazione.

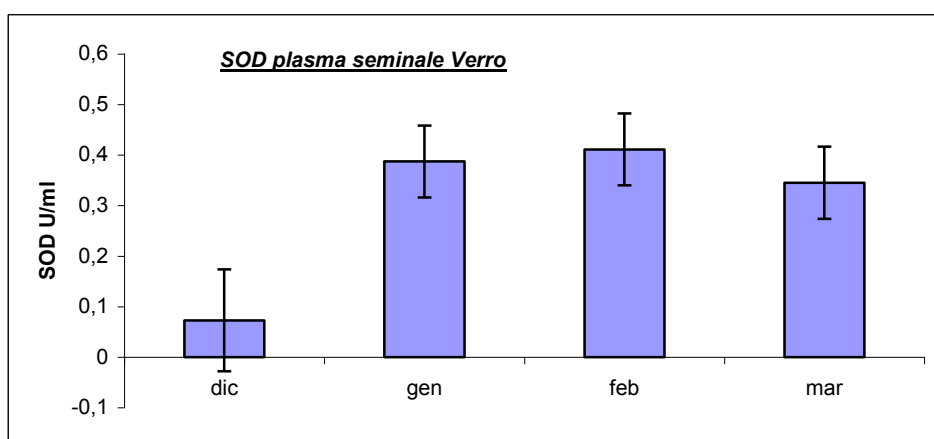


Grafico 8: Andamento della concentrazione della superossido dismutasi (SOD) nel plasma seminale di verro nel periodo annuale che va da dicembre a marzo

A differenza di quanto avviene per il plasma seminale, l'estratto mostra differenze statisticamente significative ($p=0,0140$).

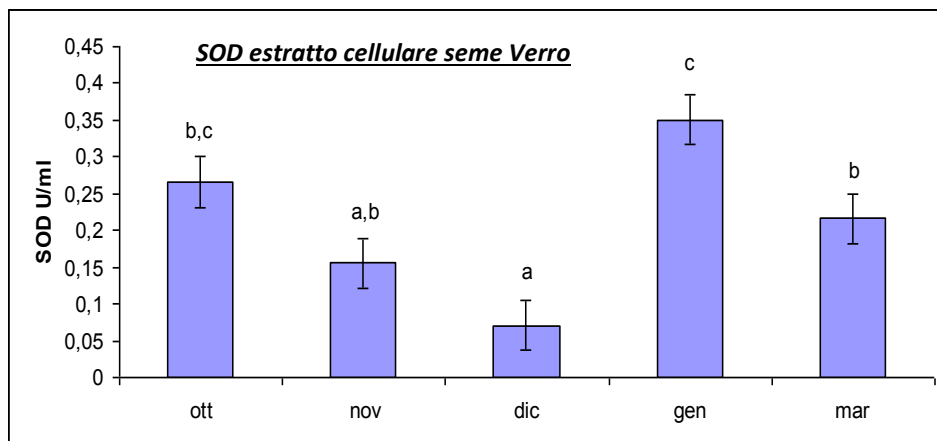


Grafico 9: Andamento della concentrazione della superossido dismutasi (SOD) nell'estratto di seme di verro nel periodo annuale che va da dicembre a marzo

- **Determinazione MDA**

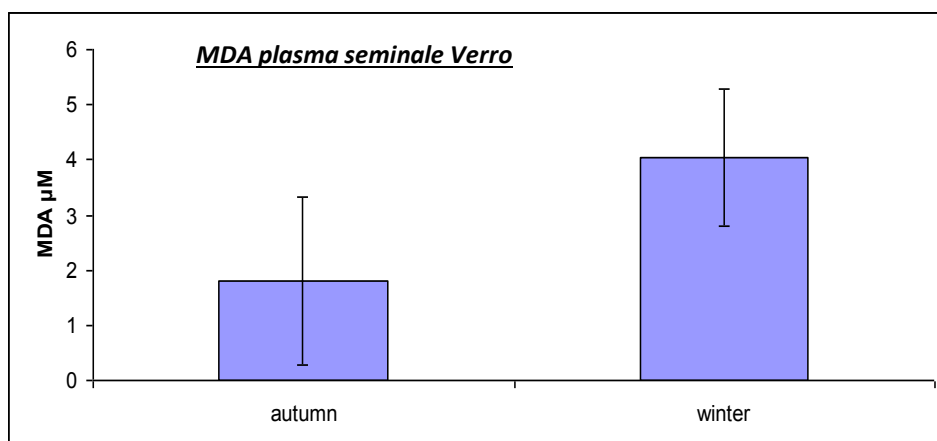


Grafico 10: Confronto della concentrazione della Malonildialdeide (MDA) nel plasma seminale di verro in due stagioni dell'anno. L'analisi statistica dei dati ottenuti non ha mostrato significatività.

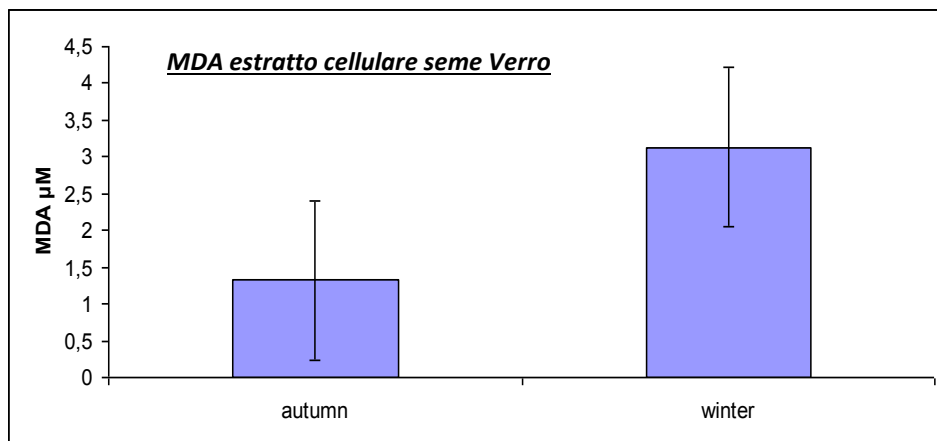


Grafico 11: Confronto della concentrazione della Malonidialdeide (MDA) nell'estratto di seme di verro in due stagioni dell'anno. L'analisi statistica dei dati ottenuti non ha mostrato significatività.

- **Determinazione TEAC**

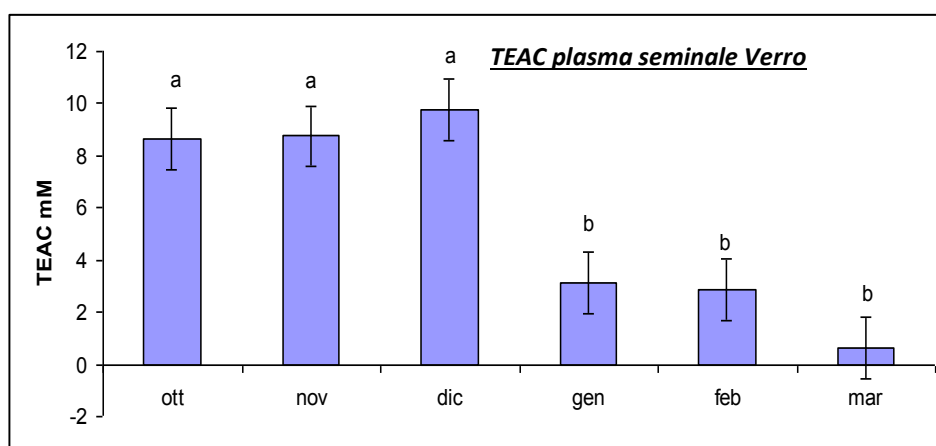


Grafico 12: Andamento della concentrazione della capacità antiossidante totale (TEAC) nel plasma seminale di verro nel periodo annuale che va da ottobre a marzo. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,0055$).

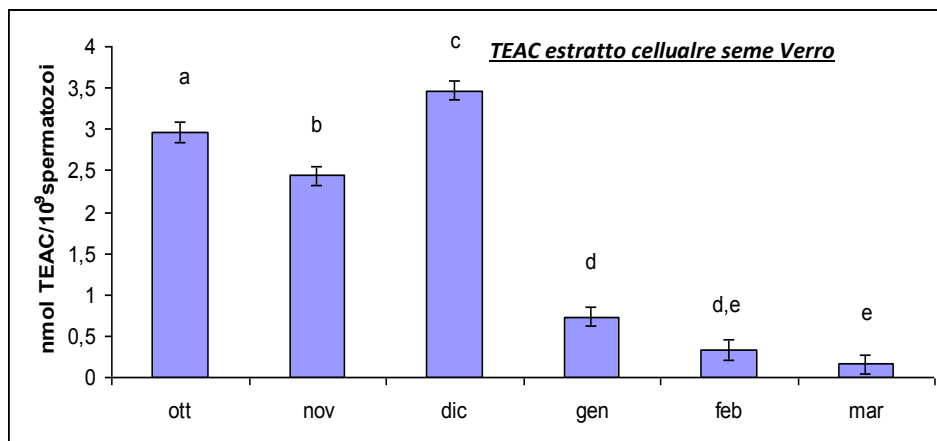


Grafico 13: Andamento della concentrazione della capacità antiossidante totale (TEAC) nell'estratto di seme di verro nel periodo annuale che va da ottobre a marzo. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,0001$).

- **Determinazione idroperossidi test d-Roms**

Il dosaggio degli idroperossidi mediante test d-Roms si è rivelato nullo per tutti i mesi dell'anno, sia nel plasma seminale sia nell'estratto cellulare.

- **Dosaggio ATP**

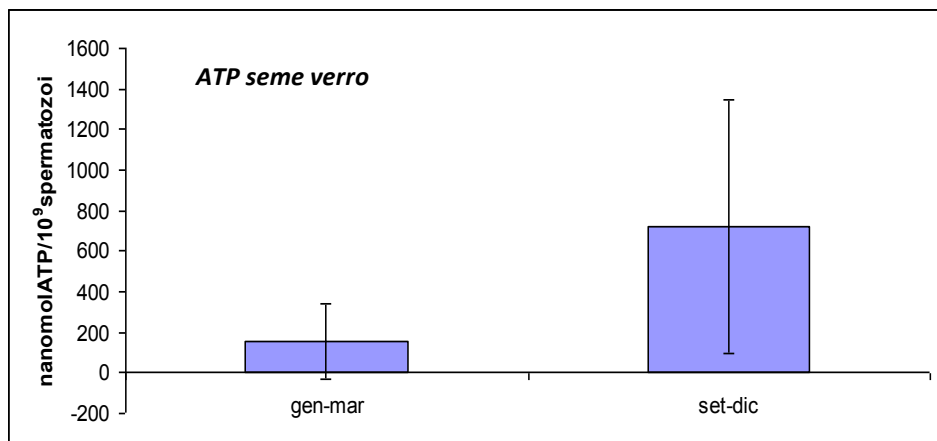


Grafico 14: Andamento della concentrazione dell'ATP nel seme di ariete nel periodo annuale che va da ottobre ad aprile. I dosaggi dell'ATP non hanno dimostrato differenze statisticamente significative.

4.2 Risultati 2° Esperimento

Il liquido follicolare di suino è stato prelevato con cadenza mensile durante tutti i mesi dell'anno. Ogni mese, il campione veniva stoccato a temperature di -80°C per essere analizzato in un secondo momento.

- **Determinazione della SOD**

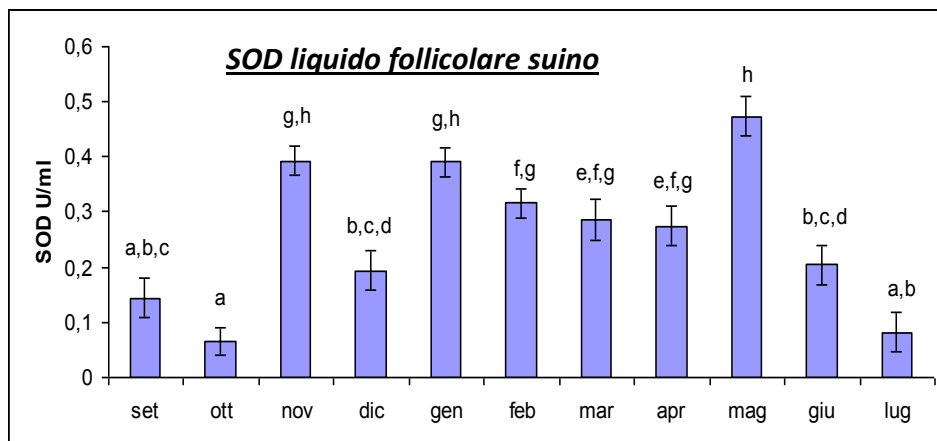


Grafico 15. Andamento della concentrazione della superossido dismutasi (SOD) nel liquido follicolare di suino nel periodo annuale che va da settembre a luglio. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,0061$).

- **Determinazione MDA**

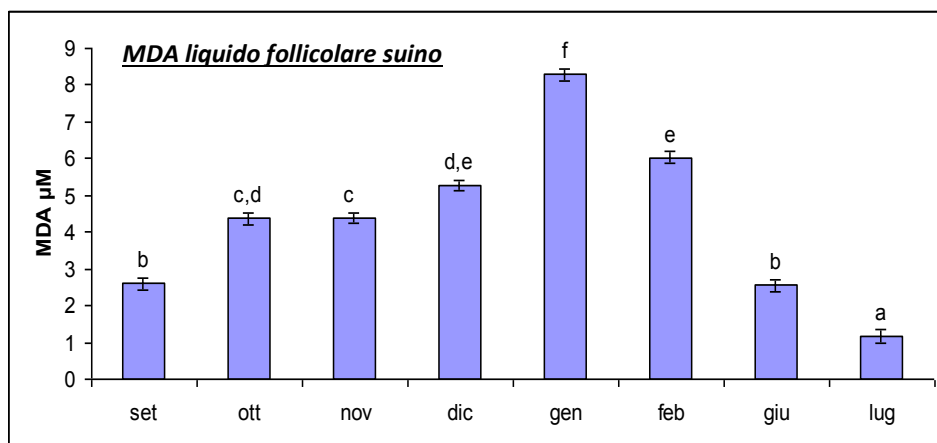


Grafico 16. Andamento della concentrazione della malonidialdeide (MDA) nel liquido follicolare di suino nel periodo annuale che va da settembre a luglio. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,0058$).

- **Determinazione idroperossidi con il Test D-roms**

D.ssa Daniela Addis, Influenza dell'azione degli antiossidanti nella capacità fecondante dei gameti maschili e femminili,

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

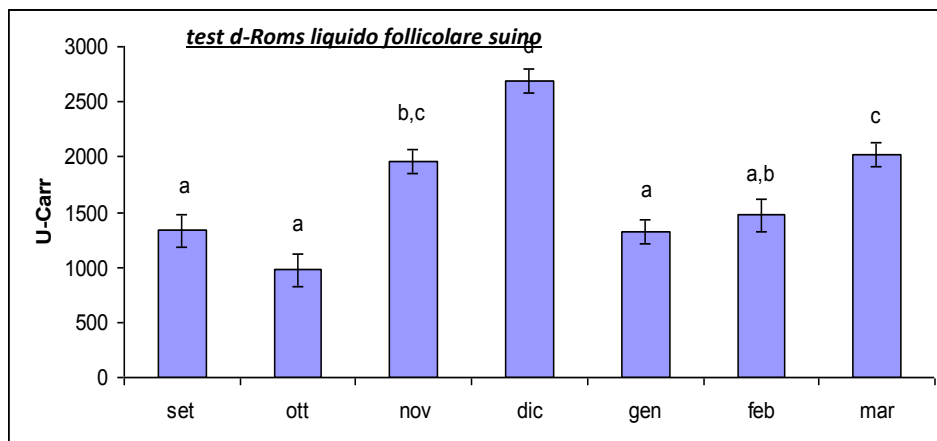


Grafico 17. Andamento della concentrazione degli idroperossidi nel liquido follicolare di suino nel periodo annuale che va da settembre a luglio. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,0045$).

- **Determinazione TEAC**

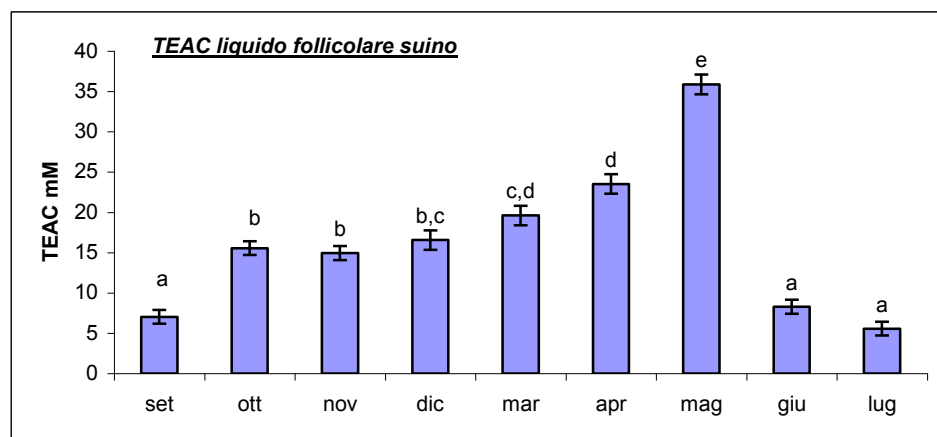


Grafico 18. Andamento della concentrazione della capacità antiossidante totale (TEAC) nel liquido follicolare di suino nel periodo annuale che va da settembre a luglio. L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,0001$).

4.3 Risultati 3° Esperimento

D.ssa Daniela Addis, Influenza dell'azione degli antiossidanti nella capacità fecondante dei gameti maschili e femminili,

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

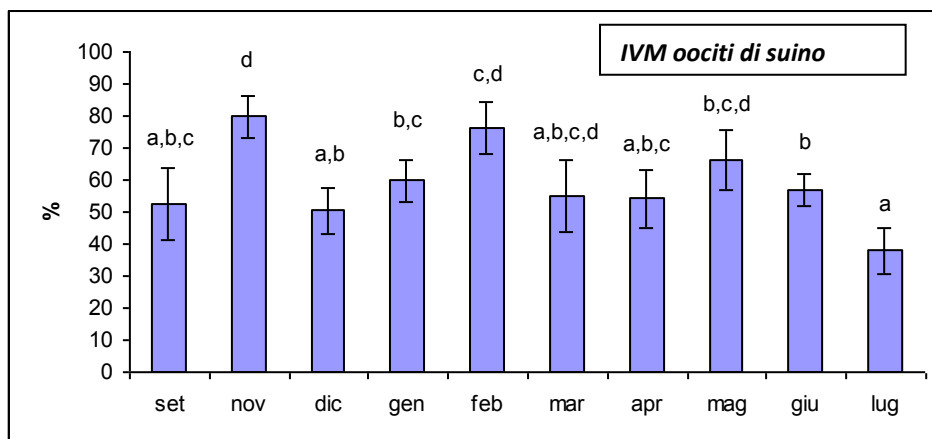


Grafico 19. Maturazione in vitro (IVM) di oociti di suino maturati con liquidi follicolare prelevati nei diversi periodi dell'anno (da settembre a luglio). L'analisi dei dati ottenuti ha mostrato differenze statisticamente significative ($p=0,01$).

4.4 Risultati 4° Esperimento

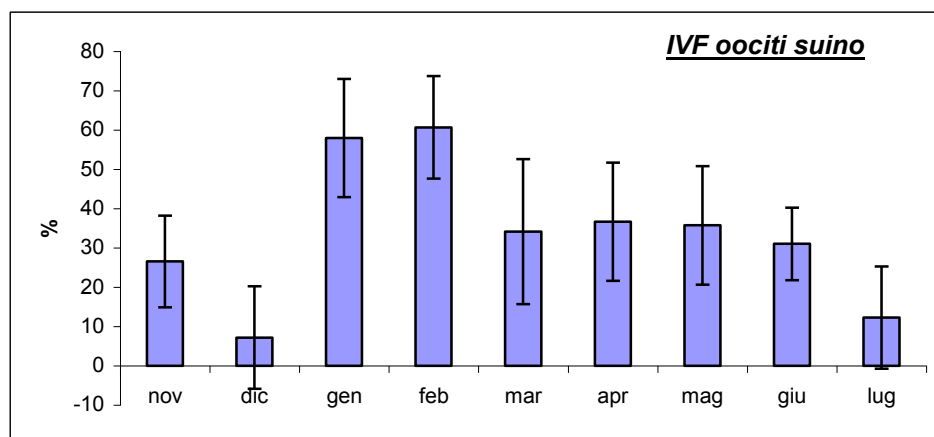


Grafico 20. Risultati di fertilizzazione omologa (IVF) di oociti di suino maturati con liquidi follicolare prelevati nei diversi periodi dell'anno (da settembre a luglio). L'analisi dei dati ottenuti non ha mostrato differenze statisticamente significative.

4.5 Risultati 5° Esperimento

D.ssa Daniela Addis, *Influenza dell'azione degli antiossidanti nella capacità fecondante dei gameti maschili e femminili*,

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

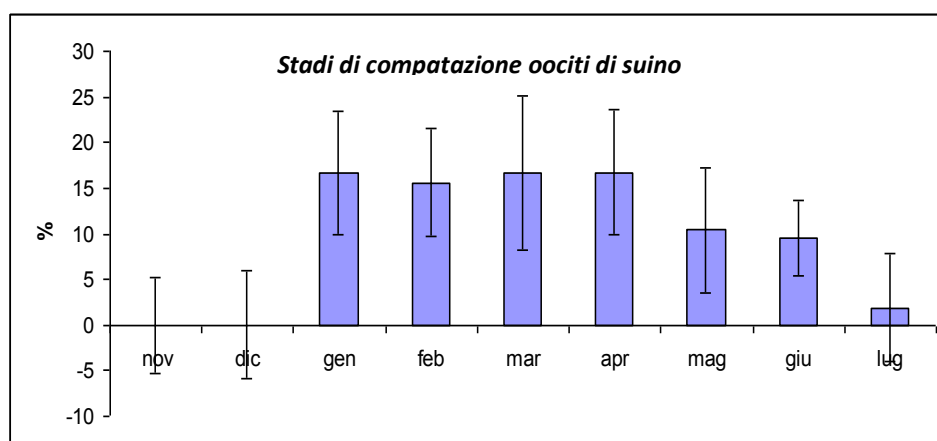


Grafico 21. stadi di compatazione di oociti di suino maturati con liquidi follicolare prelevati nei diversi periodi dell'anno (da settembre a luglio). L'analisi dei dati ottenuti non ha mostrato differenze statisticamente significative.

4.6 Risultati 6° Esperimento

Tabella 7: Intensità della fluorescenza emessa dagli oociti di suino dopo colorazione con MT-Red.

Stadio nucleare	N	media	+/- SD
GV	26	18,5545 ^a	1,77415
MII Aprile	39	25,4828 ^b	1,53717
MII Giugno	27	19,9985 ^a	1,74698
MII Luglio	25	16,3946 ^a	1,67741
MII Marzo	23	19,617 ^a	1,79549

ANOVA, diversi indici indicano differenze statisticamente significative: $P=0,001$. I risultati dimostrano che l'intensità della fluorescenza risulta maggiore negli oociti in MII

maturati con il liquido follicolare stoccato nel mese di Aprile con valori statisticamente significati comparati agli altri gruppi sperimentali. Non si evidenziano invece differenze tra gli altri gruppi sperimentali.

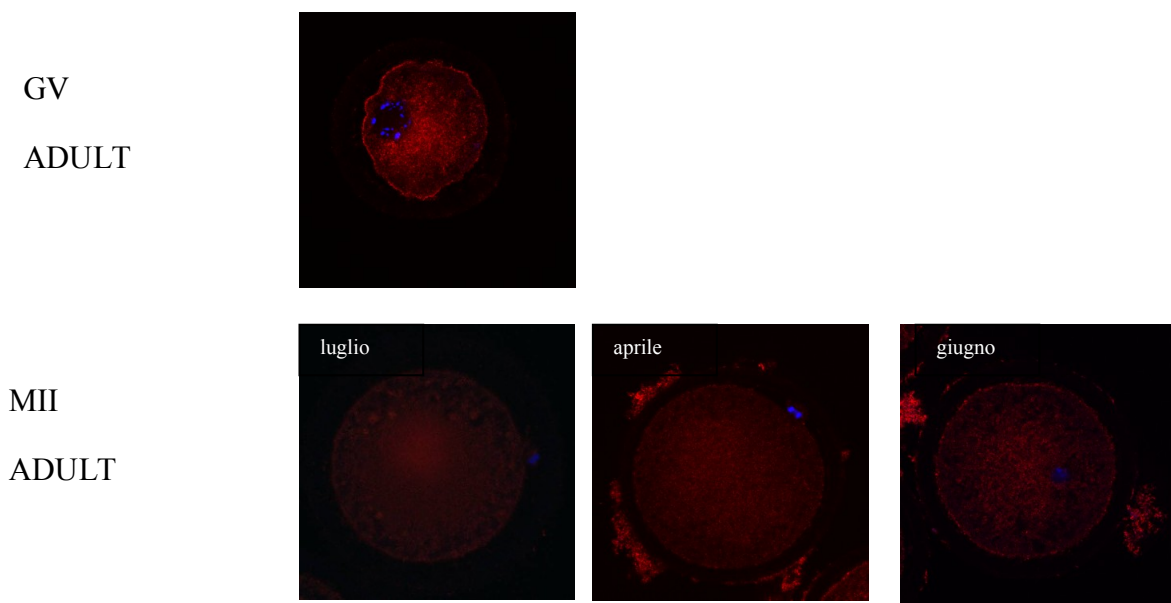


Foto 1. Immagini al confocale degli oociti di suino dopo colorazione con MT-Red per i diversi liquidi follicolari usati per la loro maturazione.

Tabella 8. Intensità della fluorescenza emessa dagli oociti di suino dopo colorazione con la sonda H₂DCFDA e analisi al microscopio confocale.

Stadio nucleare	N	media	+/- SD
GV	26	17,6434 ^a	2,18762
MII Aprile	39	26,0198 ^c	1,89541
MII Giugno	27	29,5637 ^c	2,15412
MII Luglio	25	23,6747 ^{b,c}	2,06833
MII Marzo	23	19,555 ^{a,b}	2,21394

ANOVA, diversi indici indicano differenze statisticamente significative: P=0,001

I risultati dimostrano che la quantità di radicali liberi, evidenziati mediante colorazione con la sonda H₂DCFDA, risulta maggiore negli oociti in MII maturati con il liquido follicolare stoccato nel mese di Aprile e di Giugno con valori statisticamente significativi comparati agli altri gruppi sperimentali. Gli oociti in GV mostrano invece i valori statisticamente inferiori mentre i mesi di Luglio e Marzo presentano dei valori intermedi rispetto ai precedenti gruppi sperimentali considerati.

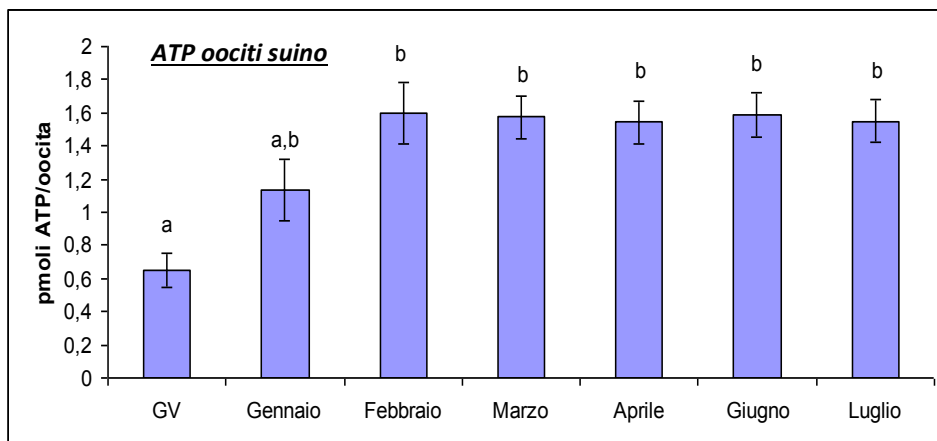


Grafico 22: Andamento della concentrazione dell'ATP negli oociti di suino maturati con diversi liquidi follicolari relativi ai diversi periodi annuali (da gennaio a luglio) confrontati con i valori di ATP di oociti in GV. Le differenze statisticamente significative sono state riscontrate fra MII e GV ma non fra gli oociti in MII maturati nei differenti liquidi follicolari ($p=0,075$).

5. DISCUSSIONE

Il protocollo sperimentale usato in questo lavoro ha previsto tre fasi, nella prima sono state condotte delle prove di maturazione in vitro degli oociti di suino utilizzando le metodiche descritte dalla letteratura, per acquisire in questo modo le capacità e le conoscenze atte a capire i complessi meccanismi fisiologici che governano la maturazione degli oociti. nella seconda fase ci si è concentrati su un componente fondamentale del medium di maturazione, fra tutti il più variabile in quanto di tratta del liquido follicolare, derivante direttamente dai follicoli ovarici.

Infine nella terza fase si sono effettuate le prove di maturazione e fecondazione in vitro, secondo i risultati ottenuti dalle analisi degli antiossidanti contenuti. I liquidi follicolari che hanno mostrato le caratteristiche antiossidanti migliori sono stati messi a confronto per valutarne l'influenza sulla capacità di sviluppo degli oociti durante le fasi di maturazione e fertilizzazione in vitro.

Sono stati presi in considerazione alcuni fra i maggiori rappresentanti degli antiossidanti corporei e i più importanti indici di stress ossidativo: SOD, MDA, Idroperossidi e Capacità antiossidante totale.

Sono stati in oltre effettuati degli studi per la valutazione della qualità oocitaria ed embrionale, ponendo in relazione i diversi liquidi follicolari, per capire quanto effettivamente sia importante il ruolo degli antiossidanti capacità fecondante dei gameti. A questo proposito sono stati condotti degli studi anche sul seme, in particolare di verro e ariete per poter capire se esistono delle differenze nella quantità di antiossidanti che possono influire anche sulla capacità fecondante del gamete maschile. Secondo la nostra ipotesi quindi, alla base della ridotta competenza degli ovociti provenienti dalle ovaie nei diversi periodi dell'anno potrebbe esserci una quantità di antiossidanti nell'ambiente

D.ssa Daniela Addis, Influenza dell'azione degli antiossidanti nella capacità fecondante dei gameti maschili e femminili,

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

follicolare, che potrebbe portare ad alterare i meccanismi che controllano lo stress ossidativo causando quindi sofferenza per l'ovocita.

Questa situazione è aggravata anche dal fatto che, al termine della fase di crescita, l'ovocita presenta un aumento del metabolismo ossidativo (Van Blerkom J. Et al. *Reproduction* 2004;)

La produzione di energia è, infatti, fondamentale per ovociti ed embrioni ed è necessaria per supportare lo sviluppo durante le fasi embrionali preimpianto. La generazione di energia da parte della cellula dipende soprattutto dalla fosforilazione ossidativa, un processo che utilizza l'ossigeno quale substrato. L'ossigeno diventa, così, un indice dell'attività metabolica totale degli ovociti e degli embrioni (Leese HJ. 2003). Utilizzando modelli di coltura embrionale in vitro, è stato dimostrato che la sovra-produzione di ROS intracellulari durante le prime fasi di sviluppo embrionale si ripercuote sul metabolismo ed è dannosa per la sopravvivenza embrionale (Johnson MH et al. 1994)

Dallo studio del 2° esperimento è stato evidenziato come nel mese di maggio in cui le temperature ambientali sono superiori ai 20°C il liquido follicolare presenta una un quantitativo di SOD maggiore, (Grafico 15) e questo si rispecchia nell'elevata concentrazione di TEAC (capacità antiossidante totale) presente nello stesso periodo (Grafico 18). Al contrario, il mese che ha mostrato una quantità di SOD minore, è stato quello di ottobre, seguito dal mese di luglio (Grafico 15). Per la TEAC, i mesi con una quantità minore, sono stati giugno, luglio e settembre. (Grafico 18). Seppure la superossido dismutasi non rappresenta l'unico sistema antiossidante presente, da questi risultati si potrebbe ipotizzare che influisce notevolmente sul quantitativo di capacità antiossidante totale nel liquido follicolare di suino. I parametri di stress ossidativo presi in

considerazione nel nostro studio, ossia la malonildialdeide (MDA) e le specie reattive dell'ossigeno (ROMS) non sembrano invece correlati con la quantità di SOD e TEAC riscontrati, mostrando infatti i maggiori valori nei mesi di gennaio (TEAC) come mostrato nel Grafico 16, e dicembre (ROMS) come mostrato nel Grafico 17. Per questi ultimi due parametri (TEAC e ROMS) i mesi con minore stress ossidativo si sono dimostrati luglio per l' MDA e settembre ottobre e gennaio per i ROMS.

Nonostante ci si aspetterebbero dei risultati diversi, ipotizzando che l'aumento di SOD e TEAC è direttamente proporzionale a quello di ROS ed MDA, gli studi da noi effettuati non hanno confermato questa ipotesi. Questo potrebbe essere dovuto ad altre specie di antiossidanti presenti nel liquido follicolare da noi analizzati, in grado di contrastare meglio gli indici di stress ossidativo che invece abbiamo deciso di indagare (MDA e ROMS). Analizzando i dati della maturazione in vitro di oociti di suino maturati con liquidi follicolari (PFF) prelevati in diversi periodi dell'anno (Grafico 19), si è notato che le percentuali maggiori di maturazione si ottengono con oociti maturati con PFF del mese di novembre. Mentre i risultati con percentuali minori di IVM si notano nella maturazione con PFF di luglio. I dati di IVM hanno dimostrato differenze statisticamente significative. Lo stesso purtroppo non è stato confermato dai dati della fertilizzazione in vitro (IVF) (Grafico 20) né da quelli della compattazione embrionale (Grafico 21).

A questo punto, avendo il quadro generale dei dati ottenuti sullo studio del PFF, siamo portati a pensare che bassi quantitativi di capacità antiossidante totale influiscono negativamente sull'IVM, infatti nel mese di luglio, in cui la TEAC ha valori più bassi, si hanno anche le percentuali di maturazione minori. Seppur non si può dire esattamente lo stesso per le percentuali maggiori di IVM, che dai risultati ottenuti ci si aspetterebbe di avere a maggio, quando la TEAC è ai livelli massimi, va comunque notato che nel mese di maggio che ha mostrato maggiore quantità di TEAC (Maggio), le percentuali di IVM si

mantengono comunque alte. Un altro risultato che ha attirato la nostra attenzione è stato Per quanto riguarda tutti gli altri dosaggi, non sono state riscontrate particolari differenze che possano essere correlate al successo della maturazione in vitro, ne in quello della fertilizzazione.

Per riuscire a spiegare la variabilità dei risultati ottenuti sono stati considerati altri fattori di tipo biologico e ambientale che possono aver influenzato i dati.

Infatti, il suino non ha un ciclo riproduttivo stagionale, è una specie che presenta delle modificazioni riproduttive tutto l'anno (Prunier *et al.* 1996) e la durata della fase di luce non sembra influenzare la secrezione delle gonadotropine nelle scrofe primipare. Seppur quanto descritto da Prunier *et al.*, va considerato che il prolungamento del fotoperiodo, unitamente a un innalzamento della temperatura ambientale, porta le scrofe ad alimentarsi di meno, arrivando persino a uno stato di malnutrizione. Questi fattori influenzano lo stato del benessere dei suini e con innalzamento di stress fisico e conseguente aumento di produzione di sostanze ossidanti. Il tutto si ripercuote inevitabilmente sulle attività fisiologiche dell'animale, e certamente sull'aspetto riproduttivo.

In considerazione di quanto appena detto, è molto probabile che i bassi valori delle percentuali di IVM nel mese di luglio, siano legati all'aumentare delle temperature ambientali, che alle nostre latitudini superano in questo periodo di gran lunga i 30° C.

Dalle analisi effettuate sulla quantità di ATP presente negli oociti di suino, maturati con i diversi liquidi follicolari, non sono state dimostrate differenze statisticamente significative tra i gruppi MII, mentre l'analisi statistica ha mostrato significatività fra lo stadio GV ed MII (Grafico 22).

Partendo da quanto decritto per il liquido follicolare, anche nei verri esiste una certa correlazione con temperature ambientali e fotoperiodo, pur non essendo il suino un animale notoriamente influenzato da quest'ultimo.

Dai nostri studi è risultato che la capacità antiossidante totale (TEAC) risulta massima nei mesi di ottobre, novembre e dicembre nel plasma seminale (Grafico 12) e nel mese di dicembre nell'estratto cellulare degli spermatozoi (Grafico 13). Questo è compatibile con quanto enunciato da Superchi et al., 1998, secondo cui nei verri si è notato che con un aumento delle ore di luce la funzione riproduttiva è influenzata negativamente, come conseguenza della modificazione della secrezione di steroidi. La SOD è risultata invece in contrasto con i risultati ottenuti per la TEAC, infatti, i dati mostrano come nell'estratto cellulare, essa aumenta nel mese di gennaio e diminuisce in quello di dicembre. (Grafico 9) con differenze statisticamente significative. Lo stesso non si può dire per la quantità di SOD nel plasma seminale, in quanto la statistica non ha mostrato differenze significative, seppur, come può essere notato dal Grafico 8, i valori aumentano a gennaio e febbraio, mentre risultano bassi a dicembre.

Da questi dati, si può notare come esiste una sorta di compensazione tra le difese antiossidanti date dalle quantità di TEAC e SOD nell'estratto cellulare. Infatti, nello stesso mese in cui la TEAC aumenta (dicembre) diminuisce la SOD. Questo può essere riportato, come per il PFF, al fatto che la SOD rappresenta solo uno dei meccanismi che compone l'intero sistema delle difese antiossidanti della cellula.

Per quanto riguarda gli indici di stress ossidativo presi in considerazione possiamo notare che i ROS si sono rivelati sempre nulli in tutto l'arco temporale preso in esame, mentre l'MDA non ha mostrato differenze statisticamente significative sia nel plasma seminale che nell'estratto cellulare degli spermatozoi. Una differenza d'obbligo da considerare nel caso del seme è anche quella fra la funzione svolta dal plasma seminale e quella dello spermatozoo. Mentre il gamete maschile è sicuramente la componente seminale con

maggior importanza per la fecondazione, il plasma seminale ha la funzione di veicolare gli spermatozoi all'interno delle vie genitali femminili, e grazie alle sostanze in esso contenute è una fonte di energia immediatamente disponibili per il metabolismo e il movimento degli spermatozoi. Nel caso specifico del verro in oltre il secreto delle ghiandole bulbo uretrali è molto importante per la formazione del caratteristico gel dell'eiaculato che determina la chiusura del canale cervicale della scrofa dopo l'eiaculazione. Nel plasma seminale infine sono presenti anche quelle sostanze che "educano" l'organismo materno a riconoscere gli spermatozoi come cellule "tollerabili" affinché essi non vengano immediatamente distrutti dal sistema immunitario della femmina. Queste differenze nella funzione di plasma ed estratto sono compatibili con le differenze mostrate dai dati.

Anche per il seme sono state effettuate delle analisi per valutare la produzione intracellulare di ATP perché come è noto il metabolismo energetico è uno dei fattori chiave che influenzano la funzionalità dello spermatozoo e l'ATP nel seme supporta molte attività della cellula come la motilità, la capacitazione e la reazione acrosomiale; come si nota dal Grafico 14, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative.

Infine i parametri di vitalità, motili progressivi e rapidi non hanno mostrato differenze significative nei mesi considerati. (Tabella 6)

Da quanto meso in evidenza, possiamo enunciare che la capacità antiossidante totale è probabilmente il parametro che influisce maggiormente sullo sviluppo dell'ocita, ma non possiamo correlarlo con gli antiossidanti presi in considerazione in questo studio.

Tenendo presenti anche le condizioni climatiche delle nostre altitudini e le temperature ambientali decisamente superiori ai 30°C nel mese di luglio,

in considerazione del fatto che il plasma seminale rappresenta un'importante fonte di antiossidanti, come dimostrato anche in altre specie fra cui il toro (Bilodeau *et al.*, 2000), per cui si sarebbe potuto ipotizzare un effetto benefico dell'utilizzo di seme con le caratteristiche antiossidanti migliori effetto che in realtà non è stato osservato in considerazione del periodo riproduttivo e delle quantità di antiossidanti possedute nello stesso periodo dell'anno.

Per ciò che concerne il seme di Ariete, gli studi effettuati hanno messo in evidenza un andamento particolare della capacità antiossidante totale. Essa infatti, nel plasma seminale tende ad aumentare nei periodi notoriamente riproduttivi di questa specie e diminuisce in corrispondenza dei mesi di riposo riproduttivo (Grafico 5), seguendo quindi quanto già noto sull'influenza del fotoperiodo sul sistema riproduttivo degli arieti

Nell'estratto cellulare invece l'andamento riportato dal Grafico 6 ha andamento Gaussiano, per tutto l'arco temporale studiato (da ottobre a luglio). Questo andamento che non è compatibile con il fotoperiodo, è presumibilmente dovuto alle differenze funzionali fra plasma seminale ed spermatozoi, già descritte per il verro. Per cui, mentre gli spermatozoi, non mostrano una costanza nei valori della capacità antiossidante totale, durante i vari mesi studiati, il plasma seminale, che rappresenta l'ambiente in cui essi sono contenuti segue perfettamente l'andamento del fotoperiodo. La TEAC mostra nel plasma seminale il valore più alto nei mesi di ottobre e novembre, quello più basso nei mesi di maggio, giugno e luglio, seppur dal grafico 5 si nota che da luglio inizia a riaumentare. Le differenze sono statisticamente significative. Nell'estratto seminale invece il mese che mostra un quantitativo di TEAC maggiore è giugno, mentre quello che mostra un quantitativo minore

è marzo. Anche per la TEAC dell'estratto cellulare, la statistica ha mostrato differenze significative.

Per quanto riguarda la SOD, nel plasma seminale essa risulta maggiore nei mesi di marzo e aprile, mentre è minima nel mese di giugno (Grafico1). Nell'estratto invece mostra i valori maggiori nei mesi di luglio, settembre, ottobre e novembre, e quelli minori a dicembre. (Grafico 2). Come si può notare mettendo i due grafici (1 e 2) a confronto si può notare come nei mesi in cui la SOD è maggiore nel plasma seminale (marzo e aprile), mantiene valori bassi all'interno dello spermatozoo negli stessi mesi. Questo potrebbe far pensare ad una sorta di "compensazione" fra il gamete e la sua sostanza veicolante.

Considerando i due indici di stress ossidativo indagati in questo studio, possiamo notare che il dosaggio delle specie reattive dell'ossigeno (ROMS) si è dimostrato sempre nullo (come nel verro) in tutti i mesi indagati. L'MDA ha rivelato differenze statisticamente significative sia nel plasma seminale (Grafico 3) che nell'estratto (Grafico 4). Nel plasma il valore più alto è quello di novembre, mentre risultano valori più bassi nei mesi di febbraio e aprile. Per l'estratto invece, il valore più alto lo ha mostrato giugno, mentre quello più basso, febbraio. Questi dati mettono in mostra che la quantità di MDA non è direttamente proporzionale a quella della capacità antiossidante totale, contrariamente a come si può pensare. Occorrerebbero però studi più specifici su questa relazione, per capirne i meccanismi che la regolano.

Anche sul seme di ariete è stato effettuato il dosaggio dell' ATP intracellulare e i dati hanno mostrato differenze statisticamente significative. L'ATP è risultata maggiore a novembre e minore a ottobre, dicembre, gennaio e aprile. Questi risultati non sono direttamente correlabili con l'influenza del fotoperiodo su questa specie animale.

6. CONCLUSIONI

Durante questo percorso di dottorato, si è cercato di capire al meglio quali potessero essere tutte le condizioni che potevano influire in modo positivo o negativo, sulla capacità di fecondazione dei gameti maschili e femminili. In particolare lo studio si è concentrato sugli oociti di suino e sul seme di verro e ariete. Il motivo per cui la specie suina è stata presa in considerazione è dato dal fatto che rispetto ad altre specie animali trattate in laboratorio, quella suina presenta maggiori problematiche, sia nella fase di maturazione in vitro degli oociti, sia nella loro fertilizzazione. In considerazione del fatto che indagando nella letteratura scientifica non è stata trovata abbondanza di lavori in merito, si è deciso di indagare in modo più approfondito.

Da qui, l'idea di investigare sull'ambiente in cui l'oocita si sviluppa, ossia il follicolo e, più in particolare il liquido follicolare. Quali sostanze in esso contenute possono influire sul successivo sviluppo oocitario? Dopo diverse valutazioni, è stato deciso di dosare gli antiossidanti e capirne l'eventuale influenza sul gamete. In oltre, come già detto, il liquido follicolare è parte integrante del medium di maturazione del suino per cui la sua composizione continua anche in vitro ad influire. Dai risultati ottenuti attuando un monitoraggio mese per mese del liquido follicolare, possiamo concludere che gli antiossidanti influiscono sulla maturazione in vitro dell'oocita di suino e la loro presenza nel liquido follicolare varia a seconda del periodo dell'anno considerato. Il parametro maggiormente influenzante è stata la Capacità antiossidante totale (TEAC). Infatti, a valori elevati di TEAC, corrisponde anche una buona riuscita della maturazione in vitro degli oociti. Questo in oltre è stato osservato in particolare nel mese di maggio, ossia con

D.ssa Daniela Addis, Influenza dell'azione degli antiossidanti nella capacità fecondante dei gameti maschili e femminili,

Tesi di Dottorato in Scienze Veterinarie, Università degli studi di Sassari

temperature climatiche non rigide. Al contrario nel mese di luglio, mese nel quale le temperature superano facilmente i 30°C, la capacità antiossidante totale risulta essere la più bassa dell'anno e la maturazione oocitaria risulta la più scadente.

Contemporaneamente al lavoro effettuato sul liquido follicolare e sugli oociti, si è proceduto ad un monitoraggio del seme. Mentre per il verro non ci sono stati risultati particolarmente innovativi, nel seme di ariete si è notato il particolare andamento della TEAC in corrispondenza dei periodi dell'anno di attività e riposo riproduttivi. Durante la stagione riproduttiva infatti il seme ha un'alta capacità antiossidante totale, mentre questa risulta diminuire nei mesi di "riposo".

Concludendo, questo studio risulta utile a chi si occupa di riproduzione in vitro delle specie oggetto di indagine, per la concentrazione dello stoccaggio di liquido follicolare in determinati periodi dell'anno, e conseguentemente per la manipolazione degli oociti stessi, mentre questo tipo di lavoro può essere evitato nel mese di luglio, date le scarse caratteristiche qualitative antiossidanti, con un notevole dispendio di tempo e risorse. Per quanto riguarda l'ariete invece, quest studio può servire da conferma a precedenti studi, nei quali si evince che i periodi maggiormente favorevoli per la manipolazione del seme (per es. la crioconservazione), risultano essere quelli concomitanti alla stagione riproduttiva.

7.BIBLIOGRAFIA

Guerriero G. (2009). Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Annals New York Academy of Sciences*; 1163:154-68.

Celino FT, Yamaguchi s, Miura C, Ohta , Tozawa Y, Iwai T, Miura T, Tolerance of spermatogonio to oxidative stress is due to hight levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoS One*. 2011 Feb 18; 6 (2): e 16938. Doi: 10.1371/journal.pone.0016938

Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 2005, 89, 65–75.

Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi, Cerolini S, Penny P, Noble R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Theriogenology* 2005, 63, 411–421.

Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N. Sperm cryopreser- vation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 2000, 21, 1–7.

Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscoc C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2007, 68, 204–212.

Almeida J, Ball BA. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 2005, 87, 321–337.

Golas A, Malek A, Piasecka M, Styrna J. Sperm mitochondria diaphorase activity – a gene mapping study of recombinant inbred strains of mice. *Int. J. Dev. Biol.* 2010, 54, 667-673.

Neild DM, Brouwers JFHM., Colenbrander B, Aguero A, Gadella BM. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular reproduction and development* 2005, 72, 230–238.

Clegg ED. Mechanism of mammalian sperm capacitation. In "*Mechanism and control of animal fertilization*" by Academic Press, Inc; 1983, 178–212.

Bedford JM. Report of a workshop: Maturation of the fertilizing ability of mammalian spermatozoa in the male and female reproductive tract. *Biol. Reprod.* 1974, 11, 346–362.

Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G,

Hunter RH, Petersen .H, Greve T. Ovarian follicular fluid, progesterone and Ca²⁺ ion influences on sperm release from the fallopian tube reservoir. *Mol. Reprod. Dev.* 1999, 54, 283–91.

McKinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction, Williams & Wilkins, Philadelphia* 1993, 705–754.

Zhang Q., Bai Q., Yaun Y., Liu P. (2010) Assessment of Seminal Estradiol and Testosterone Levels as Predictors of Human Spermatogenesis. *J. Androl.*; Vol. 31, No. 2.

Parminder K. and Bansal M.P. (2003). Effect of selenium-induced oxidative stress on the oxidation reduction system and reproduction ability of male mice. *Biological Trace Element Research* ; Vol 97.

Eddy E, O'Brien D. The spermatozoon. In: Knobil E, Neill JD (eds). *The physiology of reproduction, vol 1, 2nd edn.* Raven Press, New York, 1994, 29–77.

Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 758-764.

- Russe I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat* 1983; 24: 77-92
- Picton H, Briggs D, Gosden R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 1998; 145: 27-37.
- Tripathi A, Kumar KV, Chaube SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. *J Cell Physiol* 2010; 223: 592-600.
- Motta PM, Nottola SA, Makabe S, Heyn R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod* 2000; 15 Suppl 2: 129-147.
- follicle development. *Reproduction* 2006; 132: 191-206.
- Fair T, Hulshof SC, Hyttel P, Greve T, Boland M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anat Embryol (Berl)* 1997; 195: 327-336.
- Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian
- Braw-Tal R, Yossefi S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil* 1997; 109: 165-171
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 2001; 65: 994-999.
- Adashi EY. Intraovarian regulation: the IGF-I example. *Reprod Fertil Dev* 1992; 4: 497-504.
- Hsu CJ, Holmes SD, Hammond JM. Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 147: 242-247.
- Greenwald G, Terranova P. *Physiology of reproduction*. New York: E. Knobil and J.D. Neill, Raven Press; 1988.
- Driancourt MA, Thatcher WW, Terqui M, Andrieu D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. *Domest Anim Endocrinol* 1991; 8: 209-221.

- Bao B, Garverick HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 1998; 76: 1903-1921
- Eppig JJ. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. *Bioessays* 1991; 13: 569-574.
- Swamy M, Sirajudeen KN, Chandran G. (2009). Nitric oxide (NO), citrulline-NO cycle enzymes, glutamine synthetase, and oxidative status in kainic acid-mediated excitotoxicity in rat brain. *Drug Chem Toxicol.*; 32(4):326-31.
- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. (2004). The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des.*; 10(14):1677-94.
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. (2006). Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta.*; 1763(7):747-58.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.*; 2006 Mar 10;160(1):1-40.
- Celino FT, Yamaguchi S, Miura C, Miura T.(2009). Arsenic inhibits in vitro spermatogenesis and induces germ cell apoptosis in Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Reproduction*; 138(2):279-87.
- Turner TT and Lysiak JJ (2008). Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. *J Androl.*; 29(5):488-98.
- Kobayashi SD, DeLeo FR. (2009). Role of neutrophils in innate immunity: a systems biology-level approach. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.*; Nov-Dec;1(3):309-33.
- Zhonghua L, Dong W, Sheng Z, Ye Bing Z, Z.. (2011). Studying the lipid peroxidation index, morphology and apoptosis in testis of male BALB/c mice exposed to polybrominated diphenyl ether (BDE-209). *Anhui Medical University*; 29(4):294-8.

- Spiteller G. (2006). Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products. *Free Radic Biol Med.* ; Aug 1;41(3):362-87.
- Salo DC, Pacifici RE, Lin SW, Giulivi C, Davies KJ. (1990). *J Biol Chem.*; Jul 15;265(20):11919-27.
- Davies MJ, Donkor R, Dunster CA, Gee CA, Jonas S, Willson RL. (1987). Desferrioxamine (Desferal) and superoxide free radicals. Formation of an enzyme-damaging nitroxide. *Biochem J.*; Sep 15;246(3):725-9.
- Wolf RE, Graeber GM, Burge JR, DeShong JL, MacDonald JL, Zajtchuk R. (1986). Evaluation of serum creatine kinase and lactate dehydrogenase in experimental myocardial infarction, atriectomies, and thoracotomies. *Ann Thorac Surg.*; 41(4):378-86.
- Chalah T, Brillard JP. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology* 1998, 50, 487-493.
- Bergmeyer HU. Standardization of enzyme assays. *Clin. Chem.* 1972, 18, 1305–1311.
- Dean RT, Giese S, Davies MJ. (1993). Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends Biochem Sci.*; 18(11):437-41.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.*; 7(1):65-74.
- Fujii J, Tsunoda S. (2011). Redox regulation of fertilisation and the spermatogenic process. *Asian J Androl.* May; 13(3):420-3.

- Imai H.; Hirao F.; Sakamoto T.; Sekine K.; Mizukura Y.; Saito M.; Kitamoto T.; Hayasaka M.; Hanaoka K.; Nakagawa Y. (2003). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 305: 278–286.
- Puglisi R., Tramer F., Carlomagno G., Gandini L., Panfili E., Stefanini M., Lenzi A., Mangia F., Boitani C. (2005). PHGPx in spermatogenesis: how many functions? *Contraception*; 72 291-293.
- Drevet JR (2006). The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Mol Cell Endocrinol.*; 250(1-2):70-9.
- Aitken AE, Lee CM, Morgan ET. (2007). Roles of nitric oxide in inflammatory downregulation of human cytochromes P450. *Free Radic Biol Med.*; 44(6):1161-8.
- Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. (2001). Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update.*; 7(5):473-81
- Tarin JJ, Gomez-Piquer V, Pertusa JF, Hermenegildo C, Cano A. Association of female aging with decreased parthenogenetic activation, raised MPF, and MAPKs activities and reduced levels of glutathione S-transferases activity and thiols in mouse oocytes. *Mol Reprod Dev* 2004; 69: 402-410.
- Dumollard R, Carroll J, Duchon MR, Campbell K, Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20: 346-353.
- Van Blerkom J, Davis PW, Lee J. ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1995; 10: 415-424.
- Wilding M, De Placido G, De Matteo L, Marino M, Alviggi C, Dale B. Chaotic mosaicism in human preimplantation embryos is correlated with a low mitochondrial membrane potential. *Fertil Steril* 2003; 79: 340-346.

Rashidi A, Shanley D. Evolution of the menopause: life histories and mechanisms.

Menopause Int 2009; 15: 26-30.

Moffatt O, Drury S, Tomlinson M, Afnan M, Sakkas D. The apoptotic profile of human cumulus cells changes with patient age and after exposure to sperm but not in relation to oocyte maturity. Fertil Steril 2002; 77: 1006-1011.

Miao YL, Kikuchi K, Sun QY, Schatten H. Oocyte aging: cellular and molecular changes, developmental potential and reversal possibility. Hum Reprod Update 2009; 15: 573-585.

Nasr-Esfahani et al., 1990.

Luciano AM, Pocar P, Milanesi E, Modena S, Rieger D, Lauria A, Gandolfi F. Effect of different levels of intracellular cAMP on the in vitro maturation of cattle oocytes and their subsequent development following in vitro fertilization. Mol Reprod Dev 1999;

A. Alberti, L. Bolognini, D. Macciantelli, M. Caratelli]Research on Chemical Intermediates January 1, 2000, Volume 26, Issue 3, pp 253-267 The radical cation of *N,N*-diethyl-*para*-phenyldiamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples

Balestri F, Giannecchini M, Sgarrella F, Carta MC, Tozzi MG, Camici M.

Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. *Neurochem Int.* 2007;50:517–523.

Zinellu A¹, Pasciu V, Sotgia S, Scanu B, Berlinguer F, Leoni G, Succu S, Cossu I, Passino ES, Naitana S, Deiana L, Carru C *Anal Bioanal Chem.* 2010 Nov;398(5):2109-16. doi: 10.1007/s00216-010-4186-6. Epub 2010 Sep 12. Capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection for ATP quantification in spermatozoa and oocytes.

Klebanoff CA, Gattinoni L, Torabi-Parizi P, Kerstann K, Cardones AR, Finkelstein SE, Palmer DC, Antony PA, Hwang ST, Rosenberg SA, Waldmann TA, Restifo NP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 5; Central memory self/tumor-reactive CD8⁺ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells

Hutt KJ, Albertini DF. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed online* 2007; 14:758-764

Bilodeau JF, Chatterjee S, Sirard MA, Gagnon C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* 2000, 55, 282–288.

Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* 1995, 7, 659–668.

Funahashi H, Cantley TC, Day BN. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod.* 1997 Jul;57 (1): 4953

De Jonge C, Barratt CL Gamete donation a question of anonymity. *Fertil steril.* 2006 Feb; 85(2):500-1

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969 Nov 25;244(22):6049-55

Leese HJ. What does an embryo need? *Hum Fertile (Camb).* 2003 Nov;6(4):180-5

Van Blerkom J Mitochondrial in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. *Reproduction.* 2004 Sep; 128(3):269-80.Review

Rath MC, Mahal HS, Mukherjee T. Photophysics of melatonin in different environments. *Photochem Photobiol.* 1999 Mar; 69(3):294-300

Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story.

Eichenlaub-Ritter U, Staubach N, Trapphof T Chromosomal and cytoplasmic context determines predisposition to maternal age-related aneuploidy: brief overview and update on MCAK in mammalian oocytes

Tarin JJ, Gómez-Piquer V, Pérez-Albalà S, Hermenegildo C, Cano A. Predictive variables of in vitro fertilization and pre-implantation embryo development in the mouse.