



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI**

---

**SCUOLA DI DOTTORATO IN**

**RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI  
ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE**

Direttore: Prof. Sergio Ledda

**INDIRIZZO: Riproduzione, Produzione e Benessere Animale (XXV CICLO)**

(Coordinatore: Prof. Sergio Ledda)

**VALUTAZIONI PLURIENNALI DELLE CARATTERISTICHE  
RIPRODUTTIVE IN STALLONI IMPIEGATI IN UN  
PROGRAMMA DI MONITORAGGIO DEL MATERIALE  
SEMINALE**

Docente Guida

**Prof. Sergio Ledda**

Tutor

**Dr. Raffaele Cherchi**

Direttore

**Prof. Sergio Ledda**

Tesi di dottorato del

**Dr. Andrea Taras**

**ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013**

# INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	14
<b>CAPITOLO I</b>	
<b>FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLO STALLONE</b>	<b>27</b>
1.1 CELLULE DEL SERTOLI	27
1.2 CELLULE DEL LEYDIG	32
1.3 SPERMATOZOO	35
1.3.1 TESTA	37
1.3.2 CODA	38
1.3.3 SPERMATOGENESI	41
1.4 EPIDIDIMO	47
1.5 ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-TESTICOLO	52
1.5.1 ORMONI TESTICOLARI	59
1.5.2 ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE	74
1.5.3 INTERAZIONI TRA ASSE RIPRODUTTIVO E ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE	80
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	89
<b>CAPITOLO II</b>	
<b>TECNICHE DIAGNOSTICHE</b>	<b>142</b>
2.1 VALUTAZIONE MATERIALE SEMINALE	142
2.1.1 ASPETTO MACROSCOPICO	143
2.1.2 VOLUME	143

2.1.3	CONCENTRAZIONE	143
2.1.4	MOTILITA'	144
2.1.5	MORFOLOGIA	147
2.1.6	pH	161
2.2	ESAME ECOGRAFICO	162
2.3	DOSAGGI ORMONALI	172
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	178
 <b>CAPITOLO III</b>		
	<b>PARAMETRI RIPRODUTTIVI</b>	<b>202</b>
3.1	STAGIONE	202
3.2	ETA'	206
3.3	NUMERO DEI PRELIEVI	214
3.4	DIMENSIONI TESTICOLARI	221
3.5	RAZZA	227
3.6	FERTILI/IPOFERTILI	228
	<i>BIBLIOGRAFIA</i>	241
 <b>PARTE SPERIMENTALE</b>		
	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>259</b>

<i>BIBLIOGRAFIA</i>	264
<b>SCOPO DEL LAVORO</b>	<b>265</b>
<b>RISULTATI</b>	<b>267</b>
<b>DISCUSSIONI</b>	<b>281</b>
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	295
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>303</b>
<b>ALLEGATI</b>	

## INTRODUZIONE

Mentre nei bovini e suini la selezione avviene principalmente sulla base della performance riproduttiva, negli stalloni questa non rappresenta uno dei principali criteri di selezione<sup>(1)</sup>. I veri indici di fertilità sono rappresentati dalle percentuali di gravidanza e di puledri nati, sebbene tali parametri siano entrambi retrospettivi e fortemente influenzati da fattori non dipendenti dallo stallone quali lo stato riproduttivo della fattrice e la gestione aziendale<sup>(2-4)</sup>. Per valutare le performance riproduttive nello stallone sono stati utilizzati diversi indici di fertilità. La percentuale dei parti è ovviamente il dato ultimo e ci dà informazioni circa la percentuale di puledri nati sul totale delle cavalle coperte da un determinato stallone nel corso dell'anno precedente. Tuttavia l'utilizzo di questo parametro presenta numerose limitazioni. Infatti non tiene in considerazione il numero dei cicli necessari per ingravidare una cavalla ed è fortemente influenzato dai fattori di management aziendale. Per di più i dati sulla fertilità vengono ottenuti solo a distanza di un anno. Altri parametri tra cui la percentuale di gravidanza per stagione di monta e la percentuale di gravidanza per ciclo possono essere utilizzati in una fase decisamente più precoce. Tuttavia viene spesso a mancare il resoconto non venendo le cavalle diagnosticate gravide nel centro in cui si trovano gli stalloni sia che esse vengano sottoposte ad inseminazione artificiale sia a monta naturale. Una possibilità per valutare la

fertilità dello stallone è data dal mancato ritorno delle cavalle o dalla mancata richiesta di nuove dosi di seme da parte del veterinario esterno<sup>(1)</sup>. Una situazione analoga può essere riscontrata anche nei centri di produzione di materiale seminale bovino o suino. Il parametro del mancato ritorno, nel centro di produzione di materiale seminale, delle femmine ad un determinato periodo dopo l'inseminazione viene dunque utilizzato per la valutazione della fertilità dei soggetti<sup>(5,6)</sup>. In numerose circostanze comunque è necessario effettuare una valutazione della “fertilità potenziale” di uno stallone con largo anticipo rispetto ad una diretta ma retrospettiva valutazione della fertilità. In tale contesto viene ormai universalmente riconosciuta l'importanza dell'esame clinico dell'apparato riproduttore e la valutazione convenzionale del materiale seminale quali alternative alla valutazione dei dati sulla fertilità<sup>(7,8,9)</sup>. L'ipofertilità dello stallone rimane un importante aspetto della gestione riproduttiva del cavallo ed ai veterinari viene frequentemente richiesto di valutare stalloni per sospetti problemi di fertilità. Sebbene infatti la gestione riproduttiva e la fertilità della fattrice giochino un ruolo centrale in molte di queste situazioni, problemi connessi strettamente allo stallone rimangono un aspetto importante. La determinazione dei classici parametri riproduttivi (numero degli spermatozoi, motilità e morfologia) ed un attento esame clinico sono ancora i capisaldi per la valutazione dello stallone. Comunque numerose altre tecniche diagnostiche sono disponibili per l'effettuazione di una più approfondita valutazione dello stallone

ipofertile. Tecniche d'immagine, in particolare l'ecografia, provvedono un apporto diagnostico avanzato per la valutazione dei genitali esterni ed interni mentre l'endoscopia provvede accesso all'uretra. Esistono per lo stallone una grande varietà di test biochimici e test sulla funzionalità spermatica; esami endocrini permettono la valutazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-testicolo e test genetici è probabile divengano sempre più importanti nel determinare la presenza di singoli difetti genetici e fungere da marker genetici per la fertilità dello stallone. Nonostante nel corso degli ultimi anni vi sia stato un notevole supporto diagnostico per la valutazione di stati di ipofertilità nello stallone, non si dispone ancora di un singolo test che renda prevedibile la fertilità. Il veterinario deve essere capace di stabilire la più corretta diagnosi di ipofertilità facendo uso del maggior numero di strumenti possibile<sup>(74)</sup>. L'obiettivo di un completo esame riproduttivo è quello di stabilire se un determinato stallone mostri le caratteristiche necessarie per un adeguato livello di fertilità. In campo equino vi è la tendenza a non escludere, a fronte di una carriera sportiva di elevato livello, soggetti anche chiaramente ipofertili nella convinzione di poter gestire la carriera riproduttiva del futuro stallone modificando il "book" di cavalle durante la stagione di monta e bypassando le problematiche della fertilità con le più moderne tecniche di riproduzione artificiale. In genere l'esame riproduttivo completo viene effettuato prima ancora che uno stallone inizi la sua carriera riproduttiva e va ad interessare un po' tutti gli aspetti come libido,

capacità di accoppiamento, dimensioni testicolari, capacità di produzione del seme, qualità del seme stesso (motilità e morfologia) e, dove possibile, precedenti performance riproduttive. Sebbene le caratteristiche riproduttive non si correlino rigidamente con la fertilità<sup>(10)</sup> esse consentono di disporre di informazioni utili per l'attribuzione di un determinato numero di cavalle a uno stallone o per stabilire il numero di dosi di seme che può produrre giornalmente. Jasko e collaboratori<sup>(11)</sup> hanno effettuato uno studio completo sulle correlazioni tra i parametri seminali e la fertilità e, sebbene ne abbiano riscontrato di positive tra le percentuali di spermatozoi motili, motili progressivi e morfologicamente normali con la fertilità, hanno anche riportato che la variazione di questi parametri interveniva solo per un 20% sulla variazione totale nella fertilità. Quindi l'esame clinico riproduttivo risulta utile soprattutto per scartare potenziali riproduttori non soddisfacenti. In tal senso si ritiene che la fertilità venga notevolmente compromessa quando i livelli degli spermatozoi motili progressivi o gli spermatozoi morfologicamente normali siano inferiori al 40%. Sulla base di questi dati lo studbook del KWPN pone un valore soglia del 50% per entrambi questi parametri; il fatto che venga scartato solo l'8% degli stalloni seguendo questo metodo<sup>(11)</sup> rende evidente quanto l'esame clinico riproduttivo vada ad escludere solo gli stalloni con problemi notevoli. Altri studi hanno riscontrato una scarsa correlazione tra le caratteristiche seminali e la fertilità<sup>(12,13,14,17,19)</sup> e Rousset e collaboratori<sup>(15)</sup> hanno evidenziato che per una



corretta valutazione della fertilità di uno stallone i parametri riproduttivi spesso non sono ben correlati con le percentuali di cavalle gravide mentre per avere un reale riscontro della fertilità di un dato stallone è necessario seguirne la carriera riproduttiva per 6 stagioni consecutive laddove lo stallone copra almeno 25 cavalle ogni anno oppure sino alla fine della carriera riproduttiva se ne copre meno di 25. Nello stesso studio i ricercatori hanno evidenziato che a seconda del parametro riproduttivo valutato, ad esempio forme anomale o percentuale di spermatozoi motili, erano necessari da 2 a 7 prelievi per una corretta interpretazione. Ciò ha messo in luce la scarsa efficacia del doppio prelievo ad un'ora di distanza, come proposto da Pickett e collaboratori<sup>(16)</sup> mentre è coerente con il metodo di Palmer e Fauquenot<sup>(17)</sup> che si basa su 1 prelievo giornaliero per 5 giorni consecutivi, protocollo messo in pratica dal French National Stud prima di compravendite, nell'introduzione di certi stalloni all'inseminazione artificiale o nei sospetti di ipofertilità. Nel French National Stud utilizzavano dei valori soglia per discriminare tra soggetti fertili e ipofertili anche se in realtà non si aveva la certezza di scartare tutti i soggetti ipofertili e mantenere quelli fertili. Nel 1993 ad esempio il 4% degli stalloni venivano scartati per via di parametri inferiori allo standard ma un metodo sicuramente migliore potrebbe essere quello di testare gli stalloni con 15 o 20 fattrici<sup>(18)</sup>. Uno studio di Magistrini e collaboratori<sup>(18)</sup> ha posto l'accento sulla necessità di monitorare gli stalloni almeno all'inizio della stagione di monta tenendo conto della fascia d'età visto il

probabile calo della fertilità dopo i 15 anni di età<sup>(20)</sup>. Diversi fattori possono influire sulla qualità del materiale seminale e, di conseguenza, sulla fertilità dello stallone per cui sarebbe utile effettuare un monitoraggio del seme per i successivi 1-2 mesi<sup>(18)</sup>. È importante tenere in considerazione l'età dei soggetti. Un recente studio di Najjar e colleghi<sup>(21)</sup> ha evidenziato concentrazioni e numero totale degli spermatozoi superiori nei cavalli sotto i 15 anni di età rispetto agli anziani. Inoltre risultavano superiori negli anziani anche le percentuali degli spermatozoi morti e dei motili. Lo studio si basava su un totale di 9 soggetti arabi, 5 al di sotto dei 15 anni di età e 4 al di sopra dei 15 anni. Un precedente studio di Tibary<sup>(22)</sup> su stalloni arabi evidenzia che questi possono avere una concentrazione degli spermatozoi per ml variabile tra  $149,9 \pm 100$  e  $286,8 \pm 86 \times 10^6$  mentre Jasko<sup>(23)</sup> ha riscontrato in un altro lavoro che la concentrazione variava tra  $173 \pm 118$  e  $335 \pm 232 \times 10^6$ . Comunque in uno studio di Chevalier-Clément e colleghi<sup>(24)</sup> su stalloni ipofertili sono stati definiti come fertili gli stalloni con una concentrazione spermatica minima di  $194 \pm 106 \times 10^6$  spermatozoi/ml riportando anche che gli stalloni ipofertili presentavano concentrazioni più basse ( $93 \pm 130 \times 10^6$ ) nonché percentuali inferiori di spermatozoi motili. Clement e colleghi<sup>(25)</sup> e Brito<sup>(26)</sup> hanno evidenziato che in presenza di un elevato numero di anomalie spermatiche si poneva il sospetto di ipofertilità. Posor<sup>(27)</sup> ha sottolineato che un elevato numero di spermatozoi anomali si accompagna ad anomalie del tratto riproduttivo come ad esempio il

varicocele. Jasko<sup>(28)</sup> ha riferito su una stretta correlazione tra percentuali di gravidanza per ciclo e difetti della testa degli spermatozoi. Love e collaboratori hanno riscontrato che un 1% nella percentuale delle anomalie della testa si riflette in un calo dello 0,67% nelle percentuali di gravidanza per ciclo. Altri autori<sup>(29,30)</sup> hanno riportato che la percentuale delle teste staccate dovrebbe essere nei soggetti fertili inferiore al 5%. Card<sup>(31)</sup> ha enfatizzato il concetto per cui se ci sono molte teste staccate si è di fronte ad anomalie della spermatogenesi o senescenza del tratto riproduttivo. Secondo Pesch e colleghi<sup>(32)</sup> le gocce citoplasmatiche venivano correlate negativamente con le percentuali di gravidanza, lavoro supportato da Jasko<sup>(28)</sup> con riferimento alle gocce citoplasmatiche prossimali e la fertilità mentre Love e collaboratori<sup>(33)</sup> non riscontravano tale relazione tra le gocce citoplasmatiche prossimali e la fertilità. L'esame clinico dell'apparato riproduttore e le valutazioni del materiale seminale necessitano di essere integrate con altri strumenti diagnostici in grado di valutare in maniera più accurata la fertilità di un determinato stallone. L'ecografia color-doppler è stata impiegata in medicina umana per valutare il flusso sanguigno dell'arteria testicolare e nella valutazione delle patologie testicolari associate ad una alterazione della vascolarizzazione. Il testicolo presenta una elevata richiesta metabolica in particolare per quanto concerne i tubuli seminiferi che sono esposti a particolari condizioni di bassa pressione e tensione dell'ossigeno. Tale richiesta metabolica è assicurata dalla

vascolarizzazione che, in condizioni normali, è capace di supportare il testicolo con quantità sufficienti di nutrienti ed ossigeno<sup>(50)</sup>. Diversi studi riportano che questo organo è particolarmente suscettibile alle alterazioni del sistema vascolare ed il malfunzionamento testicolare può essere causato da una moderata alterazione del supporto ematico<sup>(51,52)</sup>. In medicina umana l'esame testicolare mediante color doppler, pulsed wave e power doppler viene effettuato di routine per valutare lo stato andrologico<sup>(53,54)</sup> essendo il metodo più semplice per la misurazione del flusso ematico combinando i diversi parametri delle dinamiche di flusso<sup>(55)</sup>. In medicina umana è stato riportato che la valutazione del flusso ematico testicolare è capace di predire la funzionalità testicolare e quindi la spermatogenesi<sup>(56)</sup> ed è utile nel differenziare i vari casi di dispermia<sup>(41,55)</sup>. Inoltre Herwig e collaboratori<sup>(57)</sup> hanno dimostrato che la quantità e qualità spermatica dipende dalla perfusione del tessuto all'interno del testicolo. La riduzione del flusso sanguigno causa un danno ischemico che conduce a un deterioramento della spermatogenesi. È stato riportato che la parziale restrizione dell'arteria testicolare influisce negativamente sulla crescita, volume e struttura istologica dei testicoli di toro causando il completo o parziale arresto della spermatogenesi<sup>(58)</sup>. La caratteristica onda doppler dell'arteria testicolare è stata descritta nell'uomo ed esistono dei valori di riferimento<sup>(34)</sup>. La forma dell'onda del flusso sanguigno dei testicoli umani e canini presenta un carattere "non resistivo"<sup>(34,35,36)</sup>. Nel cavallo invece le onde sono per lo più

“resistive” a livello del cordone spermatico mentre nell’aspetto marginale dell’arteria testicolare sono principalmente “non resistive”<sup>(37)</sup>. Il carattere resistivo delle onde del flusso arterioso testicolare equino potrebbe essere dovuto all’orientamento orizzontale dell’asse lungo dei testicoli, localizzati vicino alla parete addominale, ed un cordone spermatico relativamente corto con una arteria altamente convoluta<sup>(37)</sup>. In uno studio di Pozor e McDonnell<sup>(37)</sup> sono stati ottenuti quattro parametri del flusso arterioso: due riflettevano direttamente le velocità di flusso (PSV e EDV) con EDV che si mostrava estremamente variabile come già visto in altro lavoro<sup>(38)</sup>; altri due erano parametri derivati (RI e PI) e sembrano indicatori più sensibili del flusso arterioso. La RI era più utile nel differenziare profili dell’onda arteriosa anomali. Risulta essere solitamente alterata in corso di processi infiammatori<sup>(39)</sup> e con l’avanzare dell’età<sup>(40)</sup>. Recentemente Biagiotti e colleghi hanno suggerito che la RI, così come i valori di PSV, sono validi indicatori di produzione spermatica essendo questi parametri fortemente correlati con il punteggio della frequenza di produzione spermatica<sup>(41)</sup>. Sorprendentemente nel cane<sup>(42)</sup> vari gradi di torsione del cordone spermatico non hanno un effetto misurabile sulla RI dell’arteria parenchimale mentre nei ratti un elevato grado di torsione testicolare determinava una diminuzione della RI, culminando in un’onda doppler non pulsatile, ottenuta a livello del cordone spermatico<sup>(43)</sup>. La differenza nei risultati potrebbe essere dovuta alla diversa posizione dei vasi valutati, specie differenti e tecnica. In

campo equino i soggetti più anziani presentavano valori inferiori di EDV e maggiori per RI rispetto agli stalloni di mezza età (11-15 anni) nella parte convoluta dell'arteria testicolare<sup>(37)</sup>. In medicina umana è stato mostrato che i valori della RI erano inferiori nei ragazzi prepuberi rispetto ai puberi ed aumentavano negli anziani<sup>(44,45)</sup>. È stato inoltre ipotizzato che volumi testicolari maggiori siano associati ad una RI inferiore<sup>(45)</sup>. Il flusso sanguigno retrogrado diastolico visto in soggetti anziani suggerisce qualche cambiamento connesso all'età. Tale riscontro è frequente in presenza di torsioni parziali o complete del cordone spermatico sia nei cavalli<sup>(37)</sup> sia nell'uomo<sup>(46)</sup>. Ottenere valori ripetibili delle misurazioni doppler del flusso sanguigno arterioso è tecnicamente complesso. Per ciò la maggior parte degli autori utilizzano le medie di 2-7 valori<sup>(47,48,49)</sup>. Zelli e colleghi<sup>(59)</sup> in un recente studio hanno cercato di valutare le possibili correlazioni tra le caratteristiche seminali canine ed il flusso dell'arteria testicolare. Nello studio la PSV era correlata positivamente con il volume testicolare bilaterale e negativamente con gli spermatozoi vivi. I parametri RI e PI si sono rivelati utili per lo studio della perfusione testicolare come del resto nell'uomo e negli altri animali domestici. È stata riscontrata una correlazione negativa tra RI e PI e motilità totale e progressiva ai tempi T0, T24, T48 e T72. Ad oggi non vi è una chiara spiegazione scientifica. La pressione capillare e la tensione dell'ossigeno nel testicolo sono notevolmente basse e, di conseguenza, la spermatogenesi è adattata ad un ambiente semi-ipossico con il vantaggio di

evitare un danno agli spermatozoi da parte dei radicali dell'ossigeno<sup>(60,61,62)</sup>. È stato riportato che gli stadi iniziali della spermatogenesi sono sensibili ad una moderata riduzione del flusso ematico<sup>(63)</sup> e il trattamento di cani con farmaci per ridurre la pressione potrebbero indurre un danno ai tubuli seminiferi<sup>(64)</sup>. Hsu e collaboratori<sup>(65)</sup> hanno riscontrato che una diminuzione del flusso ematico arterioso verso il testicolo causa una diminuita concentrazione e un diminuito apporto energetico di nucleotidi dell'adenina determinando un'alterata spermatogenesi secondaria al difettoso metabolismo energetico a livello mitocondriale. È dunque possibile speculare che essendo RI e PI correlate negativamente con la perfusione ematica più questi indici sono bassi più la spermatogenesi è efficiente da un punto di vista qualitativo<sup>(59)</sup>. A seguito dei riscontri clinici e delle valutazioni sulle caratteristiche del materiale seminale può rivelarsi utile anche la conoscenza dei parametri ormonali. Le alterazioni a carico degli ormoni dell'asse riproduttivo sono note<sup>(75,76)</sup>. Tuttavia è stato riscontrato che patologie croniche possono determinare uno scompenso dell'asse riproduttivo a vari livelli<sup>(66)</sup>. Tra queste si possono elencare diverse turbe metaboliche ma anche scompensi ormonali quali il diabete mellito, l'ipertiroidismo, l'ipotiroidismo e l'iperprolattinemia<sup>(75)</sup>. In tale contesto forme di stress cronico di varia eziologia possono esercitare un'azione negativa nei confronti dell'asse riproduttivo. Gli ormoni dell'asse HPA, in condizioni non-stress, aiutano la riproduzione e potrebbero giocare un ruolo determinante

nell'assunzione e gestione delle fonti energetiche<sup>(73)</sup>. È invece il passaggio ad una situazione di emergenza che determina una alterazione dell'attività degli ormoni dell'asse HPA con riflessi negativi sulla riproduzione. Nei mammiferi lo stress altera la fisiologia ed il comportamento riproduttivo secondo tre vie: inibizione degli ormoni dell'asse gonadico, alterazione della funzione erettile e alterazione del comportamento propiocettivo e recettivo. Sul piano endocrino il rilascio delle beta-endorfine ha un effetto inibitorio sul rilascio del GnRH. Inoltre si ha una diminuita sensibilità delle cellule ipofisarie al GnRH riducendo quindi notevolmente l'LH secreto. Pare che sia la secrezione della prolattina indotta dallo stress a determinare questo passaggio. Inoltre, come nelle femmine, i glucocorticoidi agiscono a livello gonadico diminuendo la capacità di risposta all'LH. Il risultato di questi passaggi è un declino del testosterone in proporzione alla durata dell'azione dello stress. Sorprendentemente la diminuzione dei livelli di testosterone è raramente sufficiente per alterare la fertilità del maschio. Molto più importante è l'effetto sulla funzione erettile nei mammiferi<sup>(73)</sup>. Nell'uomo può verificarsi un calo dei livelli di androgeni in corso di sindrome di Cushing o somministrazione di glucocorticoidi<sup>(66)</sup>. La sindrome di Cushing dell'uomo trova una stretta analogia con la pituitary pars intermedia dysfunction (PPID) del cavallo e si caratterizza per gli elevati livelli in circolo del cortisolo. Nell'uomo si riscontra ginecomastia ed è stata anche riportata l'alterazione dei parametri spermatici<sup>(67)</sup>. In questo studio uomini che ricevevano



30 mg di prednisolone per 30 giorni mostravano un calo del numero degli spermatozoi da una valutazione iniziale tra 42 e 56,4 milioni di spermatozoi per ml ad una conclusiva inferiore a 10 milioni per ml a seguito di trattamento. Era inferiore anche la motilità spermatica: all'inizio dell'esperimento era dell'80-90% mentre alla conclusione si attestava intorno al 20%. La biopsia testicolare evidenziava l'interruzione della spermatogenesi, specialmente dello stadio di spermatide. Tali cambiamenti non si verificavano negli uomini che ricevevano una dose di prednisolone pari a 10 mg. L'ipercortisolemia causa nella donna oligomenorrea, nell'uomo disfunzione erettile e, in entrambi i sessi, diminuita libido. Il ristabilirsi della normale funzione dei glucocorticoidi dovrebbe riportare alla norma la funzione riproduttiva e sessuale<sup>(66)</sup>. Sono stati evidenziati ridotti livelli di gonadotropine nonché una loro alterazione della pulsatilità e capacità di risposta cellulare al GnRH<sup>(68,69)</sup>. La produzione di sex-hormone binding globulin da parte del fegato viene ridotta dai glucocorticoidi ma si verifica anche un calo proporzionale nella produzione del testosterone. La somministrazione di prednisolone, 50mg al giorno per 2-6 mesi, a uomini sani con problemi di autoimmunità spermatica produceva una diminuzione di circa il 25% in SHBG, testosterone ed estradiolo<sup>(70)</sup>. I bassi livelli degli ormoni sessuali potrebbero contribuire nell'uomo all'assottigliamento del muscolo e dell'osso in corso di sindrome di Cushing<sup>(70)</sup>. Elevati livelli di glucocorticoidi interferiscono con l'azione dell'insulina determinando insulino-resistenza (IR), una

componente clinica comune dei cavalli affetti da eccesso di glucocorticoidi<sup>(23,59)</sup>. IR cronica, caratterizzata da iperglicemia ed iperinsulinemia, sottopongono le cellule che non sono dipendenti dall'insulina per l'assunzione di glucosio a livelli di glucosio elevati nel corso del tempo<sup>(60)</sup>. Questo effetto tossico del glucosio è importante soprattutto per le cellule endoteliali con una aumentata produzione di endotelina-1 e ridotto rilascio di NO<sup>(61)</sup>. La PPID dovrebbe essere considerata nella diagnosi differenziale di cavalle anziane che non riescono a concepire o che presentano cicli estrali anomali. La diminuita regolazione dopaminergica del rilascio degli ormoni riproduttivi e infezioni uterine croniche potrebbero contribuire all'infertilità nelle cavalle con PPID. Il trattamento di cavalle infertili mediante pergolide potrebbe determinare la ripresa della funzione riproduttiva e la normale ciclicità<sup>(71,72)</sup>. La somministrazione di pergolide su cavalle gravide non pare essere associato ad effetti collaterali. L'interruzione della somministrazione del pergolide un mese prima del parto viene raccomandata per evitare complicazioni come l'agalassia.

1. van Buiten A., van den Broek J., Schukken Y.H. and Colenbrander B. Validation of non-return rate as a parameter for stallion fertility. *Livestock Production Science* 60, 1999, pp. 13–19.

2. Sullivan J.J., Turner P.C., Self L.C., Gutteridge H.B. and Bartlett D.E. Survey of reproductive efficiency in the quarterhorse and thoroughbred. *J Reprod Fertil Suppl* 23, 1975, pp. 315–318.
3. van Buiten A., Remmen J.L.A.M. and Colenbrander B. Fertility of Shetland pony stallions used in different breeding systems: a retrospective study. *Vet Quart* 20, 1998, pp. 100–103.
4. Morris L.H.A. and Allen W.R. Reproductive efficiency of intensively managed thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet J* 34, 2002, pp. 51–60.
5. Oltenacu E.A.B. and Foote R.H. 1976. In: Proceedings of the Fourth Technical Conference Artificial Insemination and Reproduction, NAAB, Monitoring Fertility of AI-programs: Can Non Return Rate Do the Job?, p. 61.
6. Reurink A., Den Daas J.H.G. and Wilmink, J.B.M., 1990. Effects of AI sires and technicians on non-return rates in The Nether lands. *Livestock Prod. Sci.* 26, 107–118.
7. Kenney R.M., Hurtgen J.J., Pierson R., Whitterspoon D. and Simons J. Theriogenology and the Equine, Part II, The Stallion, Semen examination. *J Soc Therio* 9, 1983, p. 1100.

8. British Equine Veterinary Association. Codes of Practice for Veterinary Surgeons and Breed Societies in the United Kingdom and Ireland Using Artificial Insemination for Breeding Equids. R & W Publications (Newmarket) Ltd., Newmarket, Suffolk, UK, 1991.
9. Colenbrander B., Gadella B.M. and Stout T.A.E. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod Dom Anim* 38, 2003, pp. 305–311.
10. Parlevliet J.M. and Colenbrander B.C. 1999: Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. *Equine vet J* 31, 248–251.
11. Parlevliet J.M., Kemp B. and Colenbrander B.C. 1994: Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallion. *J Reprod Fert* 101, 183–187.
12. Kenney R.M., Kingston R.S., Rajamannon A.H. and Ramberg C.R. 1971. Stallion semen characteristics for predicting fertility. 17th Prcc. Ann. Mtg. Am. Assoc. Eq. Pratt.: 5367.
13. Dowsett K.F. and Pattie W.A., 1982. Characteristics and fertility of stallion semen. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 32: 1-8.

14. Jasko D.J., Lein D.H. and Foote R.H. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987- 1988). *JAVMA*, 197(3): 389-394.
15. Rousset H., Chanteloub P., Magistrini M. and Palmer E. 1987. Assessment of fertility and semen evaluations of stallions. *J. Reprod. Fert.. Suppl.*, 35: 25-31.
16. Pickett B.W., Sullivan J.J. and Seidel J. 1975. Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoal output. *J. Anim. Sci.*, 40: 917-923.
17. Palmer E. and Fauquenot A. 1984. Mesure et prédiction de la fertilité des étalons. Etude méthodologique. In: R. Jarrige and W. Martin-Rosset (Editors), *Le Cheval. Reproduction, sélection, alimentation, exploitation*. INRA, Paris, pp. 113-127.
18. Magistrini M., Vidament M., Clement F. and Palmer E. Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science* 42 ( 1996) 181 – 188.
19. Voss J.L., Pickett B.W. and Squires E.L. 1981. Stallion, spermatozoal morphology and motility and their relationship to fertility. *JAVMA*, 178(3): 287-289.

20. Clement F., Magistrini M., Hochereau de Reviers M.T. and Vidament M. 1991. L'infertilité, chez l'étalon: quelques explications. 17ème Journée d'étude du CEREOPA: 12-22.
21. Najjar A., Benaoun B., Ezzaouia M., Ben Maâtoug A., Magistrini M. and Ben Mrad M. Determination of Semen and Sexual Behavior Parameters of Arabian Stallions to Be Selected for an Artificial Insemination Program under Tunisian Conditions. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 8 (2): 173-177, 2010.
22. Tibary A., Bakkoury M., Anouassi A. and Sghiri A. 2005. Examen et évaluation de l'aptitude à la reproduction. In: *Manuels Scientifiques et Techniques. Reproduction Equine. Tome II: l'étalon.* Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, editor, pp. 39-184.
23. Jasko D.J. 1992. Evaluation of stallion semen. *Veterinary Clinics of North America, Equine Practice*, 8(1): 129-147.
24. Chevalier-Clément F., Hochereau de Reviers M.T., Perreau C. and Magistrini M. 1991. Alterations of the semen and genital tract of infertile stallions. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 44: 657-658.
25. Clément F., Vidament M. and Magistrini M. 1992. Estimation du pouvoir fécondant de l'étalon. *Rec. Méd. Vét.*, 168(11/12): 947-957.

26. Brito L.F.C. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. Clin. Tech. Equine Pract., 6: 249-264.
27. Posor M. 2005. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproduction tract. Theriogenology, 64: 505-509.
28. Jasko D.J., Lein D.H. and Foote R.H. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallion: 66 cases (1987-1988). J. Am. Vet. Assoc., 197: 389-394.
29. Downsett K.F., Osborne H.G. and Pattie W.A. 1984. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology, 22: 463-472.
30. Downsett K.F. and Knott L.M. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. Theriogenology 46: 397-412.
31. Card C. 2005. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. Theriogenology 64: 558-567.
32. Pesch S., Bostedt H. and Failing K. 2006. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. Anim. Reprod. Sc., 91: 285-298.

33. Love C.C., Varner D.D. and Thompson J.A. 2000. Intra and inter-variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 56: 93-100.
34. Middleton W.D., Thorne D.A. and Melson G.L. Color Doppler ultrasound of the normal testis. *Am J Radiol* 1989;152:293–7.
35. Gunzel A.R., Mohrke C. and Poulsen Nautrup C. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings. *Reprod Dom Anim* 2001;36:236–40.
36. Gumbsch P., Gabler C. and Holzmann A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Vet Rec* 2002; 151:140–4.
37. Pozor M.A. and S.M. McDonnell. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology* 61 (2004) 799–810.
38. Cochard T., Toal R. and Saxton A.M. Doppler ultrasonography features of thoracic limb arteries in clinically normal horses. *Am J Vet Res* 2000;61:183–90.
39. Jee W.H., Choe J.K., Byun J.Y., Shinn K.S. and Hwang TK. Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease. *Acta Radiol* 1997;38:1026–30.



40. Wielgos M., Bablok L., Fracki S. and Marianowski L. Doppler flow measurements in testicular artery of aging males. *Gin Pol* 1998;69(6):537–40.
41. Biagiotti G., Cavallini G., Modenini G., Vitali G. and Gianoroli L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. *BJU Int* 2002;90:903–8.
42. Lee F.T., Winter D.B., Madsen F.A., Zagzebski J.A., Pozniak M.A., Chosy S.G. et al. Conventional Color Doppler velocity sonography for the diagnosis of acute experimental torsion of the spermatic cord. *Am J Radiol* 1996;167:785–90.
43. Bude R.O., Kennelly M.J., Adler R.S. and Rubin M. Nonpulsatile arterial waveforms: observation during graded testicular torsion in rats. *Acad Radiol* 1995;2:879–82.
44. Wielgos M., Bablok L., Fracki S. and Marianowski L. Doppler flow measurements in testicular artery of aging males. *Gin Pol* 1998;69(6):537–40.
45. Paltiel H.J., Rupich R.C. and Babcock D. Maturational changes in arterial impedance of the normal testis in boys: Doppler sonographic study. *AJR* 1994;163:1189–93.

46. Pavlica P. and Barozzi L. Imaging of the acute scrotum. *Eur Radiol* 2001;11:220–8.
47. Hoffmann K.L., Wood A.K.W. and Kirby A.C. Use of Doppler ultrasonography to evaluate renal arterial blood flow in horses. *AJVR* 1997;58:697–701.
48. Cipone M., Pietra M., Gandini G., Boari A., Guglielmini C. and Venturoli M. Pulsed-wave Doppler ultrasonographic evaluation of the common carotid artery in the resting horse: physiologic data. *Vet Radiol Ultrasound* 1997;38:200–6.
49. Bollwein H., Maierl J., Mayer R. and Stolla R. Transrectal Color Doppler sonography of the a.uterina in cyclic mares. *Theriogenology* 1998;49:1483–8.
50. Bergh A., Collin O. and Lissbrant E. 2001. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction* 64, 13–20.
51. Bergh A. and Damber, J.E., 1993. Vascular controls in testicular physiology. In: de Kretser, D.M. (Ed.), *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, New York, pp. 439–468.
52. Damber J.E. and Bergh A. 1992. Testicular microcirculation a forgotten essential in andrology. *International Journal of Andrology* 15, 285–292.

53. Middleton W.D., Thorne D.A. and Melson G.L., 1989. Color Doppler ultrasound of the normal testis. *American Journal of Roentgenology* 152, 293–297.
54. Dubinsky T., Chen P. and Maklad N. 1998. Color-flow and power Doppler imaging of the testes. *World Journal of Urology* 16, 35–40.
55. Atilla M.K., Sargin H., Yilmaz Y., Odabas Ö., Keskin A. and Aydin S., 1997. Undescended testes in adults: clinical significance of resistive index values of the testicular artery measured by Doppler ultrasound as a predictor of testicular histology. *Journal of Urology* 158, 841–843.
56. Pinggera G.M., Mitterberger M., Bartsch G., Strasser H., Gradl J., Aigner F., Pallowein L. and Frauscher F. 2008. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *British Journal of Urology International* 101, 722–726.
57. Herwig R., Tosun K., Pinggera G.M., Soelder E., Moeller K.T., Pallwein L., Frauscher E., Bartsch G., Wildt L. and Illmensee, K., 2004. Tissue perfusion essential for spermatogenesis and outcome of testicular sperm extraction (TESE) for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 175–180.

58. Kay G.W., Grobbelaar J.A. and Hattingh J., 1992. Effect of surgical restriction of growth of the testicular artery on testis size and histology in bulls. *Journal of Reproduction and Fertility* 96, 549–553.
59. Zelli R., Troisi A., Elad Ngonput A., Cardinali L. and Polisca A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Research in Veterinary Science* 95 (2013) 632–637.
60. Setchell B.P., Maddocks S. and Brooks D.E., 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, second ed. Raven Press, New York, pp. 1063–1175.
61. Max B. 1992. This and that hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon. *Trends in Pharmacological Sciences* 13, 272–276.
62. Aitken R.J. 1999. The human spermatozoon: a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* 115, 1–7.
63. Bergh A., Collin O. and Lissbrant E. 2001. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction* 64, 13–20.

64. Nolte T., Harleman J.H. and Jahn W. 1995. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 47, 267–286.
65. Hsu H.S., Chang L.S., Chen M.T. and Wei Y.H. 1994. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *European Urology* 25, 71–75.
66. Baker HW. Reproductive effects of nontesticular illness. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:831–50.
67. Mancini R.E., Lavieri J.C., Muller F. et al. The effect of prednisolone upon normal and pathologic human spermatogenesis. *Fertil Steril* 17500, 1966.
68. Luton J.P., Thieblot P., Valcke J.C. et al. Reversible gonadotropin deficiency in male Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 45:488, 1977.
69. Samuels M.H., Luther M., Henry P. et al. Effects of hydrocortisone on pulsatile pituitary glycoprotein secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 78211,1994.
70. Pearce G., Tabensky A., Delmas P.D. et al. Corticosteroid induced bone loss in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83810, 1998.

71. Donaldson M.T., LaMonte B.H., Morresey P. et al. Treatment with pergolide or cyproheptadine of pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). *J Vet Intern Med* 2002;16:742–6.
72. Sgorbini M., Panzani D., Maccheroni M. et al. Equine Cushing-like syndrome: diagnosis and therapy in two cases. *Vet Res Commun* 2004;28(Suppl 1):377–80.
73. Wingfield J.C. and Sapolsky R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology*, 2003, Vol. 15, 711-724.
74. Ball B.A. Diagnostic Methods for Evaluation of Stallion Subfertility: A Review. *Journal of Equine Veterinary Science*, Vol 28, No 11 (2008).
75. Jarow J.P. Endocrine causes of male infertility. *Urol Clin N Am* 30 (2003) 83–90.
76. Roser J.F. Endocrine-paracrine-autocrine regulation of Reproductive function in the stallion. In: *Equine reproduction*, McKinnon et al., Volume 1, Chapter 99, pp. 996-1009.

## CAPITOLO I

### FISIOLOGIA DELL'APPARATO RIPRODUTTORE DELLO STALLONE

#### 1.1 CELLULE DEL SERTOLI

Le cellule del Sertoli si trovano nella lamina propria del tubulo seminifero e il loro esteso citoplasma avvolge le cellule germinali sino al lume tubulare. Più cellule del Sertoli sono contenute in un testicolo e più spermatozoi il testicolo produce<sup>(1-6)</sup>. Le probabili funzioni delle cellule del Sertoli includono la formazione della membrana emato-testicolare, il supporto strutturale per la nutrizione delle cellule germinali, il movimento delle cellule germinali all'interno dell'epitelio seminifero, il distacco degli spermatidi maturi mediante il processo della spermiiazione, la fagocitosi delle cellule germinali in degenerazione e i corpi residuali di citoplasma sempre in corso di spermiiazione, la secrezione di fluidi e proteine per mantenere gli spermatozoi in ambiente acquoso e indirizzare gli spermatozoi dai tubuli seminiferi alla rete testis e la comunicazione tra le cellule germinali in fase di sviluppo, il sottostante strato delle cellule mioidi (parte della lamina propria) e le cellule del Leydig. I complessi giunzionali tra le vicine cellule del Sertoli vanno a formare la barriera emato-testicolare che divide funzionalmente l'epitelio seminifero in compartimenti basale e adluminale. La spermatocitogenesi si verifica nel compartimento basale dove si trovano spermatogoni e spermatociti primari in fase pre-leptotene. Nella fase leptotene iniziale della meiosi gli spermatociti

primari migrano verso il compartimento adluminale dove continua la meiosi e si verifica la spermiogenesi. L'integrità della barriera emato-testicolare è conservata grazie a nuovi complessi giunzionali al di sotto degli spermatociti primari in fase leptotene prima della dissoluzione dei complessi giunzionali al di sopra delle cellule. La barriera emato-testicolare determina un isolamento immunologico di spermatociti e spermatidi<sup>(44)</sup>. Poiché il sistema immunitario in fase di sviluppo non è esposto agli spermatociti differenziati o agli spermatidi, questi vengono considerati cellule estranee e, in assenza della barriera emato-testicolare, le cellule germinali verrebbero distrutte a seguito di reazione verso gli antigeni espressi in superficie. Un danno alla barriera emato-testicolare può quindi causare un danno al testicolo, ridotta produzione spermatica o sterilità. Sebbene si tratti di un evento raro nello stallone si verifica frequentemente nel visone nero<sup>(7)</sup>. La barriera emato-testicolare restringe anche il flusso delle macromolecole e di altri componenti del fluido interstiziale verso spermatociti e spermatidi. Le cellule del Sertoli provvedono un supporto strutturale per le cellule germinali in fase di sviluppo come evidenziato dal loro stretto contatto, dall'interdigitazione delle membrane plasmatiche e le specializzazioni cellulari che permettono la comunicazione. Durante la spermiogenesi gli spermatidi sferici vengono spinti verso la superficie del lume per azione delle componenti microtubulari e microfibrillari delle cellule del Sertoli. Questi cambiamenti si verificano in concomitanza con i cambiamenti nella forma degli spermatidi che sono almeno parzialmente indotti dalle cellule del Sertoli. All'avvento della



spermiazione gli spermatidi maturi vengono spinti nel lume ma rimangono adesi, mediante un sottile stelo, alla porzione principale del citoplasma contenuta in un corpo residuale. Il corpo residuale citoplasmatico rimane circondato dalle cellule del Sertoli, dopo la rottura del gambo, risultando nella spermiazione e rilascio di spermatozoi, e viene fagocitato dalle cellule del Sertoli. Diverse cellule germinali muoiono durante il processo della spermatogenesi e queste cellule vengono rapidamente fagocitate dalle cellule del Sertoli. Sebbene cellule in fase di degenerazione possano essere viste nell'epitelio seminifero, per via della loro rapida fagocitosi da parte delle cellule del Sertoli il numero delle cellule degeneranti viste non riflette accuratamente l'effetto della morte cellulare sulla produzione potenziale di spermatozoi. Le cellule del Sertoli secernono diverse sostanze nel fluido circostante le cellule germinali e quindi nel fluido seminale del tubulo seminifero. Sebbene alcune delle sostanze siano uniche e non vengano prodotte da nessuna altra parte del corpo, altre ancora sono simili alle secrezioni dell'epididimo o altri organi. Il lattato viene secreto come fonte energetica per le cellule germinali in fase di sviluppo. Diversi studi danno un quadro completo della natura biochimica delle secrezioni più complesse<sup>(8-10)</sup>. Alcune fungono da molecole di trasporto per metalli essenziali, vitamine o ormoni verso le cellule germinali mentre altre potrebbero essere d'aiuto nella regolazione della funzione epididimale. Alcune secrezioni delle cellule del Sertoli tra cui l'ormone proteico inibina avvengono su entrambi i versanti della barriera emato testicolare riscontrandosi dunque sia

nel lume della rete testis sia nel sistema di drenaggio venoso e linfatico. La funzione delle cellule del Sertoli dipende da due ormoni: l'ormone follicolo stimolante (FSH) ed il testosterone. Inoltre negli ultimi anni si è reso evidente che le cellule del Sertoli partecipino ponendosi in comunicazione sia con le cellule germinali sia con le cellule del Leydig. Per esempio sia le cellule del Sertoli sia quelle del Leydig apparentemente secernono o rispondono ad una serie di fattori di regolazione come la  $\beta$ -endorfina prodotta dalle cellule del Leydig apparentemente per far cessare la mitosi delle cellule di supporto indifferenziate prima della pubertà<sup>(11)</sup>. L'insulin-like growth factor (IGF), l'epidermal growth factor (EGF) e il transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) potrebbero anch'essi avere un ruolo nella regolazione della funzione testicolare. I polipeptidi mitogeni prodotti dalle cellule del Sertoli potrebbero stimolare o coordinare la mitosi e la meiosi delle cellule germinali<sup>(11,12)</sup>. Diverse molecole influiscono negativamente sulla spermatogenesi agendo probabilmente sulle cellule del Sertoli piuttosto che direttamente sulle cellule germinali. Inoltre il numero di cellule del Sertoli per testicolo ed il numero massimo di cellule germinali per cellula del Sertoli sono caratteristiche della specie<sup>(13,14)</sup>, ma il numero di cellule del Sertoli presenta una elevata ereditabilità<sup>(5,6)</sup>. Nei tori si trova una diretta relazione tra numero di cellule del Sertoli nel testicolo e la produzione spermatica giornaliera del testicolo stesso. Un trattamento che diminuisca il numero di cellule del Sertoli formate prima della pubertà o che alteri la funzione delle cellule del Sertoli probabilmente influirà negativamente

sulla produzione spermatica. Le cellule del Sertoli generalmente si ritiene abbiano una popolazione stabile negli adulti. Comunque sulla base di un elevato numero di stalloni adulti il numero di queste cellule era superiore durante la stagione riproduttiva<sup>(15)</sup>. In un esperimento successivo che riguardava 186 stalloni<sup>(16)</sup> è stato visto che soggetti adulti presentavano un numero più elevato di cellule del Sertoli durante la stagione riproduttiva rispetto a quella non riproduttiva e che tra le due stagioni si avevano valori assoluti intermedi. Il fotoperiodo determina nello stallone cambiamenti stagionali nelle concentrazioni sieriche degli ormoni sessuali<sup>(17)</sup> e probabilmente è responsabile dei cambiamenti stagionali del numero delle cellule del Sertoli e altre cellule testicolari<sup>(18)</sup>. L'aumento del numero cellulare durante la stagione riproduttiva<sup>(16)</sup> potrebbe essere dovuto all'accresciuta lunghezza dei tubuli seminiferi, da 1,9 a 2,9 km, mentre non esistono alla sezione di taglio differenze stagionali per quanto riguarda il diametro tubulare e le dimensioni delle cellule del Sertoli<sup>(15)</sup>. Il numero di cellule del Sertoli per cavallo ed il peso parenchimale sono direttamente correlati alla *daily spermatozoal production* (DSP) e al numero di spermatogoni. Il numero di cellule del Sertoli per cavallo era direttamente correlato non solo al numero di spermatociti primari giovani (preleptotene, leptotene, ezigotene) ma anche al numero di spermatogoni A1.

## 1.2 CELLULE DEL LEYDIG

All'interno del tessuto interstiziale le cellule del Leydig sono in stretto contatto con i vasi sanguigni e linfatici così come con la lamina basale dei tubuli seminiferi. Il ruolo primario delle cellule del Leydig è dato dalla secrezione di ormoni steroidei fondamentali nella regolazione dell'epitelio seminifero, dell'asse ipotalamo-ipofisario e delle ghiandole sessuali accessorie. Gli ormoni steroidei sono il testosterone, l'androstenedione, l'androstenediolo, il progesterone, l'estrone e l'estradiolo. Poiché le cellule del Leydig sono la sede di produzione della maggior parte di questi ormoni il fluido interstiziale contiene una concentrazione di testosterone ed altre molecole secrete dalle cellule del Leydig più elevata rispetto al sangue periferico. Di conseguenza i tubuli seminiferi sono continuamente esposti a livelli elevati di testosterone. Questa elevata concentrazione di testosterone attorno ai tubuli seminiferi è probabilmente essenziale per la normale spermatogenesi come è stato visto in altre specie<sup>(8,10,14,16,19,20)</sup>. Nello stallone non si è a conoscenza della concentrazione minima di testosterone nell'epitelio seminifero necessaria per la normale spermatogenesi né se concentrazioni intratesticolari normali di testosterone possano essere mantenute con l'iniezione di dosi elevate di testosterone esogeno. Ciò è possibile nel ratto<sup>(16)</sup>. Negli stalloni le cellule del Leydig secernono quantità maggiori di estrogeni che non testosterone sebbene il testosterone sia lo steroide di maggiore importanza fisiologica. Oltre ad estrone

ed estradiolo il testicolo dello stallone secerne anche estriolo e due molecole insolite, equilina ed equilenina<sup>(21-26)</sup>. Sebbene il sangue venoso testicolare contenga concentrazioni straordinariamente elevate di estrone libero ed estradiolo la maggior parte dell'estrogeno secreto dal testicolo dello stallone si presenta sotto forma coniugata. Ciò rende la molecola più idrosolubile e diminuisce la bioattività. Il ruolo biologico degli estrogeni coniugati prodotti dal testicolo equino rimane oscuro. Gli enzimi coinvolti nella produzione degli ormoni steroidei nelle cellule del Leydig sono localizzati sul reticolo endoplasmatico liscio e mitocondri<sup>(27,28)</sup>. Non vi è evidenza che supporti l'ipotesi che altri elementi del tessuto interstiziale o dei tubuli seminiferi producano ormoni steroidei. Le cellule del Leydig posseggono una notevole quantità di reticolo endoplasmatico liscio (SER) dove il colesterolo viene sintetizzato ed il pregnenolone viene rapidamente metabolizzato in testosterone. Le cellule del Leydig posseggono diversi mitocondri che ospitano il processo autolimitante di produzione del testosterone ossia la formazione del pregnenolone a partire dal colesterolo. Le differenze di specie nella densità di volume del SER delle cellule del Leydig spiegano quasi del tutto le differenze di specie nella produzione in vitro del testosterone<sup>(21)</sup>. Inoltre sono state riscontrate nel cavallo notevoli correlazioni tra il volume del SER per testicolo e le concentrazioni sieriche di testosterone o il contenuto di testosterone intratesticolare<sup>(22)</sup>. Le cellule del Leydig sono già funzionali nell'embrione al secondo mese di gestazione, regrediscono nella tarda fase embrionale e nel periodo neonatale precoce e

divengono nuovamente funzionali alla pubertà<sup>(23)</sup>. Lo sviluppo delle cellule del Leydig determina nel cavallo un imbrunimento del parenchima testicolare e la crescita dei tubuli seminiferi<sup>(24)</sup>. I testicoli fetali equini sono scuri con cellule del Leydig rotonde che circondano i cordoni sessuali che poi diverranno i tubuli seminiferi e contengono le cellule altamente pigmentate che determinano l'aspetto scuro del parenchima alla sezione di taglio. Il parenchima diviene più chiaro nel momento in cui i residui delle cellule del Leydig fetali vengono rimossi prima della pubertà. Nei testicoli di 15-20 grammi di stalloni di 1-1,5 anni di età il colore è chiaro centralmente ma ancora scuro alla periferia. Le regioni scure si caratterizzano per la presenza di un interstizio nel quale le cellule interstiziali fetali in degenerazione vengono rimosse e sono associate con tubuli piccoli non sviluppati in presenza di cellule del Sertoli e gonociti. Nelle regioni chiare i tubuli seminiferi sono più grandi, hanno formato un lume e contengono spermatogoni e spermatozoi. Inoltre vi è abbondanza di cellule pigmentate di grosse dimensioni (macrofagi) e cellule del Leydig non riconoscibili<sup>(6,25,26)</sup>. Lo sviluppo delle cellule del Leydig si riscontra inizialmente nel testicolo sinistro. Il testicolo sinistro pesava più del destro nell'80% dei cavalli di età compresa tra 1 e 54 mesi<sup>(26)</sup>. Il testicolo sinistro che precede il destro nello sviluppo ed il centro che precede la regione periferica è coerente con un controllo locale dello sviluppo delle cellule del Leydig (o rimozione delle cellule interstiziali fetali) ed il controllo locale nel determinare la spermatogenesi<sup>(29)</sup> dando per certo una corretta funzionalità ormonale periferica

al testicolo. Il numero delle cellule del Leydig aumenta con l'età a partire da  $1,4 \times 10^9$  in cavalli di 2-3 anni di età sino a  $4,7 \times 10^9$  in stalloni di 13-20 anni<sup>(24)</sup>. Ciò corrisponde ad un aumento nel volume delle cellule del Leydig per testicolo da 6 ml in soggetti di 2-3 anni a 32 ml in soggetti di 13-20 anni e ad un aumento delle dimensioni testicolari da 117 a 213 grammi. In questo percorso si osserva anche un imbrunimento del parenchima. Infatti un punteggio della pigmentazione del parenchima, che riflette l'aumentato numero e concentrazione delle cellule del Leydig e che corrisponde ad una più marcata pigmentazione del testicolo, si è visto essere indicativo dell'età di cavalli tra 2 e 20 anni di età<sup>(24)</sup>. La popolazione delle cellule del Leydig cicla annualmente come quella delle cellule germinali e del Sertoli<sup>(18,27)</sup>. Cambiamenti stagionali nel numero delle cellule del Leydig sono responsabili dei cambiamenti stagionali nel volume del SER nel testicolo e, conseguentemente, nel contenuto di testosterone intratesticolare negli stalloni<sup>(22)</sup>. La produzione spermatica giornaliera è correlata positivamente con il numero delle cellule del Leydig ( $r=0,76$ ) nel cavallo e, nell'uomo, con la quantità di SER delle cellule del Leydig<sup>(28)</sup>.

### **1.3 SPERMATOZOO**

Uno spermatozoo è costituito da una testa e una coda e la struttura generale nelle diverse specie è piuttosto simile<sup>(30,31)</sup>. Gli spermatozoi del cavallo presentano nel 40-60% dei casi una coda abassiale ovvero la coda non è attaccata al centro della

base della testa. Ciò non deve dunque considerarsi patologico nello stallone mentre rappresenta una anomalia nelle altre specie. Esistono differenze di specie per quanto riguarda forma e dimensione degli spermatozoi<sup>(32)</sup>. Gli spermatozoi del toro, come quelli del verro e del becco, presentano teste appiattite<sup>(30)</sup>. Lo spermatozoo di uno stallone<sup>(31)</sup> per quanto concerne forma e dimensioni è più simile a quello degli uomini e altri primati. Nella maggior parte delle specie non sono maturi quando vengono rilasciati dai tubuli seminiferi ma richiedono cambiamenti morfologici e fisiologici nell'epididimo per diventare motili ed essere competenti. Il citoplasma in eccesso che non viene perso durante la spermiiazione, ovvero il passaggio da spermatidi a spermatozoi, si accumula nella parte finale del collo della coda in fase di sviluppo. Questo citoplasma diviene la goccia citoplasmatica situata in posizione prossimale vicino alla testa<sup>(33,34)</sup>. La membrana plasmatica avvolge l'intera cellula ma le caratteristiche e la funzione delle varie regioni differiscono notevolmente. Al di là delle differenze regionali la membrana plasmatica è costituita da un doppio strato lipidico, una interfaccia acqua-fosfolipidi e un glicocalice. Inoltre le proteine possono venire assorbite sulla superficie della membrana. Il doppio strato lipidico è costituito di fosfolipidi polari orientati con le loro catene di acidi grassi idrofobiche dirette internamente e gruppi polari idrofilici diretti esternamente verso il solvente polare, l'acqua<sup>(33,35,36)</sup>. I lipidi predominanti sono i fosfolipidi e il colesterolo. Le proteine sono intervallate tra i lipidi e rappresentano circa il 50% del peso di membrana. Alcune proteine sulla



superficie esterna contengono catene di carboidrati che tendono ad avere una carica negativa e attraggono e legano debolmente altre proteine nel medium intorno allo spermatozoo. Per via di questo materiale assorbito l'aspetto esterno della regione del glicocalice di uno spermatozoo può cambiare in funzione dell'ambiente circostante. La ratio colesterolo:fosfolipidi nella membrana plasmatica è di 0.36 che rappresenta un valore intermedio tra quello del verro e quello del toro. Come negli spermatozoi di altre specie domestiche le classi maggiori di fosfolipidi sono colina, etanolamina e sfingomieline. In generale più colesterolo è presente meno fluida o flessibile è quella parte di membrana. Il colesterolo aiuta a mantenere i fosfolipidi in una organizzazione lamellare casuale. Normalmente una adeguata quantità di colesterolo e la distribuzione casuale delle proteine della membrana integra determinano una configurazione lamellare sui fosfolipidi e viene mantenuto il normale doppio strato.

### **1.3.1 TESTA**

La testa dello spermatozoo include il nucleo con il suo envelope nucleare, l'acrosoma, la lamina post-acrosomiale e la membrana plasmatica. La forma della testa, ampia e relativamente appiattita, è in primis determinata dalla forma del nucleo che va ad occuparne la maggior parte dello spazio e contiene il materiale genetico. Il nucleo è gradualmente affusolato con una punta stretta e una parte caudale più larga con la larghezza massima nell'area centrale. Il nucleo contiene la cromatina altamente condensata, DNA legato alle protamine,

che si presenta normalmente omogeneo al microscopio elettronico. Il nucleo è racchiuso da un envelope nucleare a doppio strato contenente pochi pori. La porzione rostrale del nucleo è sovrastata dall'acrosoma che è una vescicola specializzata formata da una membrana a doppio strato e contenente enzimi idrolitici necessari per la penetrazione della superficie dell'oocita durante la fertilizzazione<sup>(37-42)</sup>. Ialuronidasi, proacrosina/acrosina e lipasi sono gli enzimi principali. La membrana acrosomiale include una cresta apicale (più evidente nel toro, verro e becco), un segmento principale e segmenti equatoriali. La lamina post-acrosomiale copre la porzione caudale del nucleo, il segmento equatoriale dell'acrosoma e l'anello posteriore. Questa struttura potrebbe avere un ruolo secondario nell'adesione dello spermatozoo alla membrana plasmatica dell'oocita al momento della fertilizzazione. L'anello caudale è un punto di fusione tra la membrana plasmatica e l'envelope nucleare nel polo caudale della testa. La fossa di impianto, alla base della testa, è un'articolazione tipo enartrosi che serve ad attaccare il collo (e il resto dello spermatozoo) alla testa. La membrana esterna dell'envelope nucleare a doppia membrana che delimita la fossa di impianto è ispessita in un piano basale distinto. Il piano basale provvede l'attacco al collo.

### **1.3.2 CODA**

La coda include una regione del collo, area di attacco alla testa, il tratto intermedio, dove si trovano i mitocondri fonte di energia, il tratto principale,

contenente il manicotto fibroso che consente flessibilità alla coda, ed il tratto finale. La coda è motile per via della presenza di un assonema che decorre lungo la coda stessa e va a terminare nel pezzo finale. Nel cavallo, come in altre specie, vi sono nove fibre dense che scorrono per vario grado lungo il pezzo intermedio e principale. Sia il centriolo prossimale sia quello distale rimangono nel collo ma il centriolo distale durante lo sviluppo della coda dà origine all'assonema (nove coppie microtubulari e una coppia centrale). L'assonema continua lungo il pezzo intermedio, il pezzo principale e il pezzo finale. È ulteriormente circondato da nove fibre dense il cui ruolo non è chiaro<sup>(43)</sup>. Fawcett<sup>(44)</sup> ha proposto che si tratti di strutture elastiche passive.

Il collo rappresenta la connessione tra il pezzo intermedio e la testa. Contiene una struttura complessa chiamata pezzo di connessione, il centriolo prossimale, diversi piccoli mitocondri e un envelope nucleare abbondante<sup>(37-39,41)</sup>. La regione del collo è fragile e il pezzo di connessione contiene diversi elementi specializzati chiamati colonne segmentate e capitulum. Il centriolo prossimale ed il pezzo di connessione probabilmente costituiscono il sito dove ha inizio il battito della coda negli spermatozoi maturi. Il centriolo distale, che si riscontra nella regione del collo di uno spermatide in fase di sviluppo, scompare durante la formazione del pezzo di connessione. Una tasca esterna membranosa di abbondante envelope nucleare si trova lateralmente al pezzo di connessione. Questi anelli o rotoli rappresentano envelope nucleare in eccesso mentre il

nucleo dello spermatozoo va incontro a condensazione e a una riduzione in volume durante la spermiogenesi. Il pezzo intermedio è caratterizzato dalla presenza di numerosi mitocondri organizzati in maniera circolare in una continua doppia spirale. Le terminazioni di due mitocondri in un ciclo della spirale sono affiancati da metà del mitocondrio della spirale superiore e inferiore. Un tipico spermatozoo di uno stallone presenta circa 50 spirali di mitocondri. Creste sono chiaramente visibili mediante microscopia elettronica a trasmissione all'interno di singoli mitocondri. I mitocondri contengono gli enzimi ed i co-fattori necessari alla produzione di ATP. Lo strato esterno o membrana del mitocondrio è ricco in ponti tiolici ed è resistente alla dissoluzione. È presente il DNA mitocondriale ma il suo ruolo nella funzione cellulare o riproduttiva non è chiaro. Centralmente rispetto alla spirale mitocondriale vi sono le nove fibre dense. Queste hanno una struttura fibrosa proteica e resistente. Si estendono dalla loro origine in contatto con le colonne segmentate, nella regione del collo dello spermatozoo, verso la lunghezza del pezzo intermedio e la maggior parte del pezzo principale. Diminuiscono gradualmente nel pezzo principale caudale e non sono presenti nel pezzo finale. Le fibre dense non si contraggono ma probabilmente smorzano l'arco del battito flagellare apportando contemporaneamente rigidità e flessibilità. L'assonema dello spermatozoo, centrale rispetto alle fibre dense, è identico nell'organizzazione alle strutture contrattili delle ciglia motili della trachea e di certi microorganismi. L'assonema rappresenta l'elemento propulsivo di uno

spermatozoo. L'assonema consiste di una coppia centrale di microtubuli circondati da un anello di nove coppiette. L'annulus è una struttura elettrondensa che si trova tra le rotazioni più caudali del manicotto fibroso del pezzo principale. Va a demarcare la fine del pezzo intermedio.

Le colonne longitudinali accompagnano tutta la lunghezza del pezzo principale. Queste colonne longitudinali si trovano dorsalmente e ventralmente. Progredendo caudalmente il manicotto fibroso si trova più vicino all'assonema mentre le fibre dense si assottigliano. Il manicotto fibroso probabilmente provvede il supporto strutturale oltre alla flessibilità essenziale per un efficace movimento di battito flagellare di definita ampiezza e flessione.

Le strutture di supporto meccanico continuano intatte per circa metà del pezzo finale per poi scomparire dopo circa 1-2  $\mu\text{m}$ .

### **1.3.3 SPERMATOGENESI**

La spermatogenesi è la somma delle divisioni e cambiamenti cellulari che esitano nella formazione di spermatozoi a partire da spermatogoni. Una più completa definizione è che la spermatogenesi rappresenta il processo cronologicamente lungo in cui pochi spermatogoni si dividono per mitosi per mantenere il proprio numero e per produrre ciclicamente spermatogoni differenziati che si dividono per mitosi producendo spermatociti primari che, a

loro volta, vanno incontro a meiosi generando spermatidi che si differenziano in spermatozoi. Gli spermatozoi vengono prodotti nell'epitelio seminifero dei tubuli seminiferi contorti. L'epitelio seminifero di uno stallone maturo è composto di cellule somatiche, cellule del Sertoli e tipi di cellule germinali differenti, spermatogoni, spermatociti primari, spermatociti secondari e spermatidi. Alla sezione di taglio di un tubulo seminifero normale, 4 o 5 generazioni di cellule germinali in crescita si organizzano in maniera ben definita<sup>(45-48)</sup>. Nello stallone, ogni strato successivo o generazione di cellule germinali in un associazione cellulare è di 12,2 giorni più vicina allo stadio di spermatozoo<sup>(49)</sup>. Il tempo richiesto per produrre uno spermatozoo da uno spermatogonio, o durata della spermatogenesi, non è influenzata dalla stagione. La durata della spermatogenesi è di circa 57 giorni nello stallone<sup>(45,49-51)</sup> e presenta tre fasi: la spermatocitogenesi (19,4 giorni) caratterizzata da mitosi e differenziazione degli spermatogoni; la meiosi (19,4 giorni) caratterizzata dallo scambio di materiale genetico tra cromosomi omologhi negli spermatociti primari seguito da due divisioni meiotiche che producono spermatidi aploidi e la spermiogenesi (18,6 giorni) caratterizzata dalla differenziazione e specializzazione di funzione che porta a spermatidi pienamente differenziati chiamati spermatozoi dopo il rilascio dall'epitelio seminifero. Nella spermatogenesi la produzione di nuovi spermatogoni competenti non è sincrona tra tubuli e non è simultanea lungo lo stesso tubulo. Da qualche parte nel testicolo nuovi spermatogoni competenti ogni secondo entrano nel processo.

Dunque ogni secondo migliaia di spermatozoi vengono rilasciati nel lume dei tubuli seminiferi. Sebbene questo rilascio continuo sembri uno spreco, assicura che almeno alcuni gameti siano sempre disponibili anche dopo una estenuante attività sessuale laddove i gameti femminili sono disponibili per la fertilizzazione. Il ciclo spermatogenico è stato diviso in stadi<sup>(52)</sup> che rappresentano diverse associazioni cellulari che cambiano naturalmente e continuamente in una data regione del tubulo seminifero.

La spermatocitogenesi è il primo evento importante della spermatogenesi e coinvolge le divisioni mitotiche di spermatogoni di diverso tipo che derivano da differenti passaggi mitotici. Gli spermatogoni derivano da gonociti situati nei tubuli seminiferi fetali durante il secondo mese di gestazione. Sono situati nella regione periferica dei tubuli seminiferi degli adulti. Una tipologia di spermatogonio è data dagli spermatogoni staminali che si dividono per mitosi producendo altre cellule staminali che continuano la linea staminale per tutta la durata della vita dell'individuo adulto ripopolando il testicolo dopo un danno alle cellule germinali più avanzate o per regressione stagionale in alcune specie che stagionalmente interrompono la spermatogenesi. Questi spermatogoni derivati dalle divisioni di cellule staminali entrano periodicamente in una serie di divisioni mitotiche di tipo proliferativo e differenziativo che culmina nella produzione di spermatociti primari. Dunque la spermatocitogenesi ha l'obiettivo di continuare la linea delle cellule germinali e produrre spermatogoni competenti

che portano alla produzione di spermatociti primari. Nel cavallo esistono 5 diversi sottotipi di spermatogoni caratterizzati da chiare differenze morfologiche e funzionali. Nello stallone, in entrambe le stagioni, la spermatocitogenesi produce un eccesso di spermatogoni e la degenerazione cellulare è un efficace meccanismo che conduce ad un numero più gestibile di spermatociti e spermatidi<sup>(53)</sup>. Il processo di rinnovamento degli spermatogoni nello stallone avviene probabilmente per un'augmentata attività degli spermatogoni A1, con caratteristiche staminali, all'inizio della spermatocitogenesi spiegando così l'augmentata produzione spermatica giornaliera nella stagione riproduttiva del cavallo<sup>(54)</sup>. Il meccanismo mediante il quale il numero di spermatogoni A venga modulato stagionalmente nei cavalli è poco chiaro. Per il cavallo è stato determinato solo l'intervallo nel quale nuovi spermatogoni attivati iniziano il ciclo spermatogenico ovvero un ciclo di 12 giorni<sup>(52,55)</sup>. Il numero di sottotipi spermatogonici non è stato confermato nel cavallo ma si considera che sia di 4-6 sottotipi<sup>(56)</sup>. Questo numero di divisioni mitotiche probabilmente non cambia stagionalmente o non influisce sui cambiamenti stagionali nella produzione spermatica giornaliera (DSP). Tutte le cellule germinali compresi spermatogoni, spermatociti, spermatidi o corpi residuali sono connessi tra loro mediante ponti intercellulari. Questi ponti tra cellule nello stesso stadio di sviluppo potrebbe facilitare lo sviluppo o la degenerazione sincrona di cellule germinali simili, la produzione di spermatogoni competenti<sup>(57)</sup>, la differenziazione di spermatidi aploidi che a questo punto possiedono un solo cromosoma sessuale e/o la



fagocitosi e la digestione di corpi residuali che permangono dopo la spermiiazione.

La spermatocitogenesi gioca un ruolo centrale nella regolazione della spermatogenesi. La meiosi è il processo mediante il quale materiale genetico viene scambiato tra cromosomi omologhi e vengono prodotti spermatidi aploidi. È un processo che si verifica solo nelle cellule germinali delle gonadi più precisamente gli spermatociti. Dopo la divisione mitotica degli spermatogoni B2 si ottengono spermatociti primari pre-leptotene. Senza divisione cellulare gli spermatociti si differenziano con cambiamenti nella funzione e nella morfologia. Aggregati di cromatina localizzati all'interno e vicino all'envelope nucleare negli spermatogoni B2 e negli spermatociti primari pre-leptotene si disperdono producendo filamenti di cromatina sottile tipici degli spermatociti primari in fase leptotene nel momento in cui questi spermatociti primari si sviluppano. Gli spermatociti primari pre-leptotene iniziano immediatamente la meiosi. Durante la fase pre-leptotene i cromosomi omologhi auto-replicano sintetizzando attivamente DNA per circa 18 ore<sup>(58)</sup>. Gli spermatogoni di tipo B si dividono per mitosi producendo spermatociti primari pre-leptotene che sviluppano in spermatociti in fase leptotene. Gli spermatociti primari diplotene che sviluppano dalla fase pachitene completano una seconda divisione meiotica. La fase zigotene segna l'inizio dello scambio di materiale genetico tra i cromosomi omologhi accoppiati, scambio che continua nella fase pachitene.

Sono pochi gli scambi che avvengono tra cromosomi sessuali. Durante la prima divisione meiotica gli spermatociti primari vanno rapidamente incontro alla metafase, anafase (separazione) e telofase (separazione completa). Gli spermatociti secondari derivano da questa divisione e contengono un numero aploide di cromosomi anche se ognuno possiede due coppie congiunte di DNA. Possiedono nuclei sferici con agglomerati di cromatina di varia grandezza. In poche ore e senza la sintesi di nuovo DNA si verifica la seconda divisione meiotica. Questa coinvolge la divisione delle coppie unite del cromosoma ed esita in spermatidi con numero aploide di cromosomi. Dunque una duplicazione di cromosomi seguita da due divisioni determina la produzione di un numero aploide di cromosomi negli spermatidi.

La spermiogenesi rappresenta la differenziazione morfologica di spermatidi sferici in spermatozoi con il loro tipico aspetto. Gli spermatidi, prodotti dalla seconda divisione meiotica, si differenziano a partire da cellule sferiche con nucleo sferico in cellule che hanno una testa allungata con nucleo condensato contenente il materiale genetico maschile; una vescicola contenente gli enzimi di penetrazione o acrosoma; una coda che provvede la motilità cellulare. Visto che la spermiogenesi non si caratterizza per una divisione cellulare la sintesi di DNA è minima durante la spermiogenesi e probabilmente rispecchia la riparazione del DNA. Le proteine della cromatina (istoni) hanno un contenuto modificato in arginina e cistina ed il numero di ponti disolforici cambia durante e dopo

l'elongazione. La spermiogenesi è divisa in varie fasi interessanti a vario livello i comparti degli spermatidi.

Il rilascio degli spermatidi dall'epitelio seminifero come spermatozoi singoli e liberi prende il nome di spermiazione. Lo spermatide in fase di sviluppo è attaccato al suo corpo residuale mediante una propaggine citoplasmatica nella regione del collo. Una piccola quantità permane nel collo come goccia citoplasmatica. Al momento della spermiazione una grossa porzione di citoplasma che si trova nello spermatide viene lasciata alle spalle come corpo residuale che viene fagocitato e digerito dalle cellule del Sertoli. Comunque sembra che l'attività lisosomiale interna al corpo residuale sia in grado di auto-degradarsi.

#### **1.4 EPIDIDIMO**

La maggior parte delle funzioni dell'epididimo non sono state studiate nello stallone ma possono dedotte dai dati disponibili<sup>(59,60)</sup> e da quelli provenienti da altre specie<sup>(61-68)</sup>. Nella testa e nel corpo dell'epididimo si possono evidenziare due o tre zone di maturazione degli spermatozoi mentre nella coda dell'epididimo vengono accumulati spermatozoi fertili in attesa di essere eiaculati. La maggior parte del fluido, proteine e altre molecole di provenienza testicolare vengono riassorbiti nei dotti efferenti e nella parte prossimale della testa dell'epididimo venendo rimpiazzati dalle secrezioni dell'epitelio epididimale. Al contrario gli spermatozoi non vengono normalmente rimossi in

sede epididimale. La composizione del fluido luminale che circonda gli spermatozoi è differente nelle successive zone funzionali ed esistono differenze regionali nei meccanismi di regolazione della funzione dell'epididimo. Gli spermatozoi che lasciano il testicolo non sono fertili mentre gli spermatozoi recuperati dalla coda dell'epididimo hanno acquisito tale caratteristica<sup>(61,62,64,65)</sup>.

Il processo per cui gli spermatozoi sviluppano la capacità di fertilizzare è chiamata maturazione degli spermatozoi ma questo è solo un aspetto dell'ampia gamma di cambiamenti in queste cellule da quando vengono formate sino alla fertilizzazione di una cellula uovo<sup>(62)</sup>. La maturazione degli spermatozoi dipende da una sequenziale esposizione degli spermatozoi a fluidi epididimali di diversa composizione. Enzimi ed altre proteine nel fluido modificano la membrana plasmatica ed altre componenti degli spermatozoi. La disponibilità di testosterone per l'epitelio specialmente nella testa e nel corpo dell'epididimo<sup>(61,64,65)</sup> è essenziale per la secrezione di certe proteine da parte dell'epitelio epididimale sebbene altre secrezioni vengono prodotte senza stimolazione androgenica. L'evidenza della maturazione degli spermatozoi include l'acquisizione della capacità fertilizzante e la motilità progressiva così come cambiamenti nella struttura spermatica, caratteristiche della membrana plasmatica e metabolismo degli spermatozoi<sup>(59,60,62,64-67)</sup>. Comunque la ritenzione semplice di spermatozoi all'interno di un dato segmento del dotto epididimale è insufficiente per indurre la maturazione degli spermatozoi<sup>(64,65,67)</sup>. Gli spermatozoi equini provenienti dalla testa o dalla parte prossimale del corpo

dell'epididimo sono immobili quando rilasciati in una soluzione salina fisiologica. Comunque la percentuale di spermatozoi motili nei campioni ottenuti dalla coda dell'epididimo e diluiti in un medium tamponato è simile a quella degli eiaculati raccolti dagli stessi stalloni. Quindi come misurato secondo la motilità progressiva la maturazione degli spermatozoi dello stallone è completata prima che gli spermatozoi entrino nella coda dell'epididimo<sup>(59)</sup>. Come dimostrato mediante l'abilità della loro membrana plasmatica di escludere la colorazione rosa dell'eosina gli spermatozoi di tutte le regioni dell'epididimo sono resistenti allo shock da freddo indotto dal rapido raffreddamento a 0°C. gli spermatozoi eiaculati comunque sono alterati da questo trattamento. Sulla base di questa ed altre osservazioni Johnson e collaboratori hanno concluso che la maturazione degli spermatozoi nello stallone non era completa finché gli spermatozoi non lasciavano il corpo dell'epididimo. Ciò è coerente con dati ottenuti da altre specie<sup>(61,64-66)</sup>, sebbene cambiamenti negli spermatozoi in grado di determinare una percentuale maggiore di embrioni vitali si verifica nella coda dell'epididimo quantomeno negli arieti<sup>(61)</sup>. Dati di laboratorio e dati limitati alla fertilità degli spermatozoi di stallone provenienti dalla coda dell'epididimo hanno portato alla conclusione che gli spermatozoi provenienti dalla coda dell'epididimo di stalloni sani potrebbero essere utilizzati per inseminare cavalle se tali spermatozoi vengono recuperati entro poche ore dopo la morte o castrazione<sup>(69)</sup>. Sebbene gli spermatozoi si trovino in tutto l'epididimo<sup>(68,70-73)</sup> la coda dell'epididimo e il dotto deferente (compresa l'ampolla) sono le maggiori

aree di accumulo di spermatozoi. Le due code dell'epididimo di un tipico stallone adulto (5-16 anni di età) contengono circa 54 miliardi di spermatozoi o il 61% del numero totale presente nel sistema dei dotti efferenti<sup>(72)</sup>. Negli stalloni le code dell'epididimo contengono più spermatozoi rispetto a quelle dei tori ma un numero molto inferiore rispetto a quelle degli arieti e verri. Nella coda dell'epididimo un numero sufficiente di spermatozoi è sufficiente per diversi eiaculati<sup>(71,72)</sup>. La dimensione testicolare, la produzione spermatica giornaliera ed il numero di spermatozoi accumulati nell'epididimo sono influenzati dall'età. Il movimento degli spermatozoi attraverso il dotto epididimale è determinato principalmente da contrazioni peristaltiche continue della muscolatura liscia nella parete del dotto all'interno della testa e del corpo dell'epididimo. Nella coda il dotto epididimale normalmente è a riposo eccetto quando la muscolatura liscia è stimolata alla contrazione. Di conseguenza il tempo richiesto per il movimento degli spermatozoi attraverso la testa e il corpo dell'epididimo non viene alterato dall'eiaculazione ed è, negli stalloni, in media di 4,1 giorni<sup>(70-73)</sup>. La fertilità degli stalloni non viene in genere compromessa nei maschi che eiaculano frequentemente poiché la frequenza di trasporto degli spermatozoi attraverso la testa e il corpo dell'epididimo non è influenzata dall'eiaculazione. Si potrebbe verificare una diminuita fertilità se il numero di spermatozoi eiaculati fosse inferiore al numero richiesto per la massima efficienza riproduttiva. L'intervallo in cui gli spermatozoi permangono nella coda dell'epididimo è influenzato dall'eiaculazione<sup>(71,72)</sup>. Il numero di spermatozoi

nella coda dell'epididimo è massimo negli stalloni a riposo sessuale ed è ridotto in quelli che eiaculano giornalmente o a giorni alterni<sup>(72)</sup>. Sebbene il tempo richiesto per il movimento degli spermatozoi attraverso la testa ed il corpo dell'epididimo è ragionevolmente simile tra le diverse specie<sup>(71)</sup> il periodo che gli spermatozoi trascorrono nella coda dell'epididimo differisce notevolmente e varia tra meno di 4 giorni nell'uomo e alcuni tori da carne a oltre 12 giorni negli arieti. Gli spermatozoi vengono prodotti in maniera continua al di là della frequenza di eiaculazione. Poiché gli spermatozoi entrano nell'epididimo con una frequenza costante devono anche lasciare il sistema dei dotti efferenti ad una frequenza relativamente costante sebbene questa frequenza sia alterata dall'eiaculazione. Sulla base della ricerca in diverse specie<sup>(74,75)</sup> tutti gli spermatozoi che entrano nel sistema dei dotti efferenti vengono probabilmente rilasciati nell'uretra mentre è difficile che avvenga il riassorbimento degli spermatozoi<sup>(71,74,75)</sup>. Nei tori e negli arieti gli spermatozoi che non vengono eiaculati al momento della copula o persi con la masturbazione vengono eliminati periodicamente con l'urinazione<sup>(75)</sup>. Probabilmente in uno stallone sano sessualmente inattivo gli spermatozoi passano in maniera intermittente dal dotto deferente all'uretra pelvica e vengono persi con l'urinazione. La causa di tali emissioni e l'intervallo tra queste sono aspetti poco studiati. Alcuni stalloni accumulano un numero estremamente elevato di spermatozoi nell'epididimo e in qualche misura anche nel dotto deferente compresa l'ampolla. In tale cavallo l'emissione spontanea probabilmente non si verifica e gli spermatozoi si

accumulano nell'epididimo fino a che non viene raggiunto il limite di distensione del dotto epididimale. Non desta dunque sorpresa il fatto che, dopo diversi giorni di riposo sessuale, il primo prelievo di materiale seminale mostri caratteristiche scadenti rispetto ai successivi ottenuti a breve distanza di tempo.

## **1.5 ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-TESTICOLO**

L'ipotalamo è la parte del diencefalo del cervello ma i suoi limiti esatti non sono stati criticamente definiti nel cavallo. Da lavori su altre specie l'ipotalamo sembra essere coinvolto nella regolazione dell'appetito e della sete, temperatura corporea, attività vasomotoria, emozione, utilizzo delle riserve nutritive del corpo, attività del tratto intestinale e vescica, stati di sonno e debolezza, comportamento sessuale e rilascio di ormoni trofici. Quest'ultimo ruolo è essenziale per il controllo della funzione riproduttiva. L'ipofisi è connessa con l'ipotalamo e si estende al disotto di esso. L'adenoipofisi sintetizza e rilascia diversi ormoni che controllano i processi riproduttivi nello stallone e nella fattrice<sup>(76,77)</sup>. La neuroipofisi, d'altro canto, non produce ormoni ma semplicemente funge da sede di accumulo per gli ormoni prodotti dal tessuto nervoso nel cervello. L'ipotalamo e l'adenoipofisi sono connessi da vasi portali che si estendono dall'ipotalamo attraverso l'infundibolo verso la pars distalis. Nel sistema portale il sangue normalmente fluisce direttamente dall'ipotalamo alla pars distalis. I vasi portali sono il solo legame diretto tra l'ipotalamo e



l'adenoipofisi. Sotto appropriata stimolazione neurale l'ipotalamo sintetizza e rilascia diversi ormoni. L'ormone direttamente coinvolto nel controllo della funzionalità riproduttiva è l'ormone rilasciante la gonadotropina (GnRH). Il GnRH viene rilasciato dall'ipotalamo con scariche brevi e pulsatili. Questo fatto associato con la rimozione rapida dell'ormone dal sangue risulta in uno stimolo pulsatile delle cellule che secernono gonadotropine nell'adenoipofisi. Un elevato numero di molecole simili al GnRH, chiamate analoghi strutturali, sono state sintetizzate e utilizzate nella ricerca per studiare e controllare la funzionalità riproduttiva. L'adenoipofisi produce almeno sei ormoni trofici ma solo due o tre hanno un ruolo diretto nella riproduzione maschile. L'adenoipofisi produce LH ed FSH in risposta diretta alla stimolazione del GnRH. L'ormone luteinizzante e l'FSH sono ormoni gonadotropi perché agiscono sulle gonadi e stimolano la loro funzione tra cui la produzione di ormoni steroidei e spermatozoi. Sebbene i dettagli della caratteristica secretoria del GnRH negli stalloni non siano disponibili il GnRH deve essere secreto in maniera pulsatile. Solo la secrezione pulsatile del GnRH può spiegare la secrezione pulsatile anche dell'LH<sup>(78-81)</sup>. Comunque in alcuni stalloni la secrezione pulsatile dell'LH non è evidente dalle analisi sul sangue giugulare soprattutto durante la stagione riproduttiva<sup>(29,81)</sup>. La secrezione di FSH è anch'essa pulsatile sebbene vi sia una maggiore variabilità nel breve periodo<sup>(29,81)</sup> riflettendo probabilmente scariche intermittenti di piccole quantità di ormone. La secrezione pulsatile dell'FSH è generalmente associata ad un episodio secretorio di LH. Sebbene siano stati fatti diversi studi sulle

concentrazioni di ormoni nel sangue degli stalloni<sup>(3,26,29,78-89)</sup> i concetti circa il controllo endocrino della funzione riproduttiva sono basati principalmente su dati di altre specie<sup>(9,28,76,90)</sup>. Esistono differenze stagionali notevoli nelle frequenze secretorie e nelle concentrazioni di tutti gli ormoni nel sangue. Nel maschio adulto la produzione di testosterone è controllata da rilasci episodici di LH che periodicamente aumentano la concentrazione dell'LH nel sangue raggiungendo a livello testicolare concentrazioni ben al di sopra del livello basale. Di conseguenza si verificano picchi episodici della produzione di testosterone con concentrazioni dell'ormone piuttosto elevate<sup>(17,24,78,81,85,88)</sup>. Il testosterone prodotto dalle cellule del Leydig entra nel sangue venoso che drena il testicolo raggiungendo il circolo generale sino all'ipotalamo e l'adenipofisi. In questa maniera il testosterone controlla il rilascio del GnRH e dell'LH mediante un feed-back lungo<sup>(79,83)</sup>.

Muyan e collaboratori<sup>(91)</sup> hanno dimostrato che gli estrogeni, in particolare l'estradiolo 17- $\beta$ , e non gli androgeni modulano il rilascio dell'LH da cellule ipofisarie di stallone poste in coltura. I risultati dimostravano che l'estradiolo aumentava significativamente il rilascio dell'LH indotto dal GnRH dalle cellule ipofisarie di stallone mentre il testosterone e il di-idrotestosterone non avevano effetto. Il testosterone nei maschi di altre specie appare avere un effetto a feed-back negativo sul rilascio del GnRH<sup>(92)</sup> cosa che potrebbe verificarsi anche nello stallone. Thompson e collaboratori<sup>(93)</sup> riportavano un effetto negativo del

testosterone sui livelli sierici di LH e sul contenuto di LH ipofisario ma alcun effetto sul rilascio dell'LH indotto dal GnRH nei castroni suggerendo che gli effetti del feed-back del testosterone nello stallone si verificano a livello sia ipotalamico sia ipofisario. Se la concentrazione di testosterone che raggiunge l'ipotalamo e l'adenipofisi è abbastanza elevata il rilascio del GnRH da parte dell'ipotalamo è soppresso ed è, di conseguenza, soppressa anche la risposta dell'adenipofisi al GnRH. Questo effetto negativo degli ormoni steroidei gonadici è attribuito allo stesso testosterone ma ciò potrebbe risultare da un effetto combinato di testosterone testicolare, estradiolo e probabilmente progesterone. Inoltre il testosterone potrebbe essere convertito in estradiolo nelle cellule bersaglio dell'ipotalamo o adenipofisi. Che gli effetti negativi degli steroidi vengano espressi sia su ipotalamo sia su adenipofisi è probabile ma non è dimostrato. A causa di questo feed-back negativo la concentrazione di LH nel sangue che entra nel testicolo presenta livelli basali così che le cellule del Leydig sono esposte a una bassa concentrazione di LH e secernono solo livelli minimi di testosterone. Al diminuire delle concentrazioni di testosterone nel sangue periferico viene meno il blocco negativo e può verificarsi il rilascio episodico del GnRH. Ciò è seguito dal rilascio di LH dall'adenipofisi, una elevata concentrazione di LH nel sangue afferente al testicolo e una rapida stimolazione delle cellule del Leydig per produrre e rilasciare testosterone. Quindi le cellule del Leydig, l'ipotalamo e l'adenipofisi sono coinvolte in un feed-back circolare che regola le concentrazioni di LH e testosterone nel sangue

periferico. Sebbene la secrezione di FSH sia anche stimolata dal GnRH, la secrezione di FSH ed LH deve essere controllata con meccanismi diversi. I picchi di secrezione dell'LH non sono talvolta accompagnati dal rilascio di FSH e viceversa<sup>(29,81)</sup>. Inoltre esiste un diverso effetto della stagione sulla secrezione di LH e FSH. La sintesi e secrezione di FSH potrebbe essere molto meno dipendente dal GnRH rispetto alla secrezione di LH<sup>(94)</sup>. Sulla base delle ricerche in altre specie l'FSH sembra agire esclusivamente sulle cellule del Sertoli all'interno dei tubuli seminiferi<sup>(9,20)</sup>. Tra le molecole prodotte dalle cellule del Sertoli vi sono diversi ormoni proteici tra cui l'inibina e l'attivina tra loro strettamente legate. Tra le altre funzioni questi ormoni agiscono sull'adenoipofisi per sopprimere, l'inibina, o stimolare, l'attivina, la secrezione dell'FSH con scarso o nullo effetto sulla secrezione dell'LH. Quindi il sistema inibina/attivina e, probabilmente, la ratio testosterone:estradiolo che agisce sull'adenoipofisi controllano la quantità relativa di LH ed FSH secrete in risposta al GnRH ipotalamico. Sebbene il testicolo dello stallone produca, cosa unica, elevate concentrazioni di estrogeni, i ricercatori non sono certi se gli estrogeni siano prodotti nelle cellule del Sertoli, cellule del Leydig o altre componenti del testicolo. In ogni caso il sangue che drena il testicolo contiene concentrazioni elevate di estrogeni che potrebbero, a livello di ipotalamo e adenoipofisi, sopprimere il rilascio del GnRH o dell'LH ed FSH mediante feedback negativo<sup>(83,94)</sup>. Altri ormoni regolano l'attività dell'asse riproduttivo nelle varie specie e tra questi in particolare la prolattina, l'ormone tiroideo, l'ormone

della crescita e gli oppioidi. La prolattina è un ormone proteico a singola catena sintetizzato dalle cellule lattotrofe nell'ipofisi anteriore e riveste un ruolo nella funzione riproduttiva nel maschio<sup>(95,96)</sup>. Modula la funzione testicolare nel verro<sup>(97)</sup>, ariete<sup>(98)</sup>, roditori<sup>(99,100)</sup> e uomo<sup>(100)</sup>. In altre specie la prolattina interviene nell'induzione della trascrizione del recettore per gli estrogeni testicolari<sup>(101)</sup>. Si è visto che influisce sui tessuti sensibili agli androgeni e, insieme all'LH e all'ormone della crescita, controlla la sintesi dei recettori per l'LH nei testicoli, attiva la sintesi degli androgeni e influisce sulla spermatogenesi<sup>(97-99)</sup>. È influenzata dalla stagione sia nella cavalla sia nello stallone<sup>(102,103)</sup> e tende ad aumentare con l'età<sup>(102)</sup>. Gli ormoni tiroidei sono fondamentali per iniziare la differenziazione delle cellule del Leydig adulte e le cellule del Sertoli<sup>(104,105)</sup>. L'ipotiroidismo durante lo sviluppo testicolare porta alla proliferazione delle cellule somatiche testicolari e a testicoli di dimensioni maggiori<sup>(104)</sup>. Una mancanza di ormone tiroideo è in grado di determinare una diminuzione nella produzione del testosterone<sup>(105)</sup>. I recettori dell'ormone tiroideo sono stati identificati negli spermatozoi, nelle cellule germinali in fase di sviluppo e nelle cellule del Sertoli, del Leydig e mioidi peritubulari<sup>(106)</sup>. I cambiamenti stagionali e gli effetti dell'ormone tiroideo non sono stati individuati nello stallone pur riscontrandosi una fluttuazione stagionale nella cavalla<sup>(103)</sup> ma in assenza di una chiara correlazione con la fertilità<sup>(107)</sup>. L'ormone della crescita (GH) influisce anch'esso sulla funzione testicolare modulando la sintesi steroidea delle gonadi e la gametogenesi<sup>(108)</sup>. È stato dimostrato che il GH

regola il rilascio dell'LH ipofisario così come la sintesi e il rilascio dell'IGF-1 testicolare<sup>(109)</sup>. La carenza di GH è associata a testicoli estremamente piccoli<sup>(110)</sup> e ridotta o assente motilità spermatica<sup>(111)</sup>. La resistenza all'ormone della crescita è associata a ridotta fertilità negli uomini<sup>(112)</sup> e potrebbe alterare la gametogenesi influenzando sulla sintesi del testosterone. Il testosterone è necessario per la produzione spermatica e per l'mRNA che codifica per i recettori GH nelle cellule del Leydig del ratto<sup>(113)</sup>. Il GH aumenta la produzione di testosterone basale o stimolato dall'hCG negli uomini con carenza di GH<sup>(114)</sup>. Nello stallone l'ormone della crescita non è influenzato dalla stagionalità<sup>(115)</sup>. Nel cavallo così come in altre specie sembra che i cambiamenti stagionali nel rilascio di GnRH e LH siano parzialmente regolati dagli oppioidi<sup>(116)</sup>. Questi agiscono come neurotrasmettitori che modulano la funzione ipotalamica sopprimendo il rilascio di GnRH durante i mesi invernali<sup>(116)</sup>. Aurich e collaboratori<sup>(117)</sup> hanno mostrato che il trattamento con un antagonista degli oppioidi, il naloxone, causa un rilascio acuto di LH negli stalloni al di fuori della stagione riproduttiva ma non durante. La regolazione oppioidergica del rilascio dell'LH sembra richiedere la presenza delle gonadi<sup>(117)</sup>. Oltre all'azione su organi distanti gli ormoni testicolari possono svolgere una attività di controllo locale sulla funzione testicolare e sulla produzione spermatica. Fattori paracrini vengono prodotti da una cellula ed agiscono su un diverso tipo cellulare mentre fattori autocrini sono prodotti da un tipo cellulare e sono rivolti allo stesso tipo cellulare. Potenziali regolatori paracrini-autocrini della regolazione testicolare e della

spermatogenesi di provato significato fisiologico includono estrogeni, testosterone, inibina, attivina, peptidi analoghi al GnRH, fattori di crescita tipo IGF-1 e il transforming growth factor alfa e beta (TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), ossitocina, vasopressina, pro-encefaline, encefaline, pro-oppio-melanocortina (POMC) e peptidi derivati dalla POMC come ad esempio le  $\beta$ -endorfine. Inoltre citochine, transferrina, glicoproteina solfata-1 (sGP-1) ed sGP-2, il peptide tipo insulina 3 (INSL3) e Pmods (un fattore paracrino secreto dalle cellule mioidi peritubulari che modula la funzione delle cellule del Sertoli) potrebbero anche giocare un ruolo paracrino-autocrino nel testicolo<sup>(118-133)</sup>.

### **1.5.1 ORMONI TESTICOLARI**

#### Testosterone

Il testosterone è un ormone steroideo prodotto dalle cellule del Leydig testicolari. Queste secernono costantemente quantità basali di testosterone e altri ormoni. Tuttavia periodicamente vengono stimulate alla produzione di testosterone con 3-8 picchi giornalieri che non rendono un singolo campione realmente rappresentativo del livello di testosterone per quel determinato stallone<sup>(134)</sup>. Sono state effettuate ricerche atte a valutare le concentrazioni ormonali nel parenchima e nella vena testicolare evidenziano concentrazioni notevolmente superiori rispetto ai dosaggi ottenuti nel sangue periferico giugulare<sup>(135,136)</sup>. Durante le produzioni di testosterone episodiche i livelli di testosterone nel testicolo possono essere anche oltre 10 volte superiori rispetto ai

livelli basali mentre la concentrazione totale di questo gruppo di androgeni a livello della vena testicolare è circa 45 volte la concentrazione presente nel sangue della vena giugulare<sup>(137)</sup>. Nell'intervallo temporale in cui le cellule del Leydig sono sottoposte alla massima stimolazione da parte dell'ormone luteinizzante (LH), le concentrazioni di testosterone nel sangue venoso testicolare possono superare i 500 ng/ml o circa 100 volte la concentrazione tipica del testosterone nel sangue venoso giugulare<sup>(137,138)</sup>.

	Testis vein	Jugular vein
17 $\beta$ -hidroxy-androgen (ng/ml)	61.5	1.3
Total non-conjugated estrogen (ng/ml)	25.4	0.058

Da Amann e Ganjam<sup>(137)</sup>.

Il percorso che porta alla sintesi del testosterone prende il nome di steroidogenesi e presenta come primo step la formazione del colesterolo sia per sintesi de-novo sia per rottura delle lipoproteine di bassa densità di provenienza dal circolo. Per analogia con i dati ottenuti da testicoli di roditori e uomo i ricercatori ritengono che in testicoli di stallone che secernono testosterone a livelli minimi la maggior parte del colesterolo deriva dalle fonti interne alle cellule del Leydig. Tuttavia durante la stimolazione da parte dell'LH o della gonadotropina corionica umana (hCG), la maggior parte del colesterolo proviene



da lipoproteine a bassa densità del circolo ematico. La steroidogenesi ha inizio con la conversione del colesterolo in pregnenolone a livello mitocondriale. Il pregnenolone viene trasferito al reticolo endoplasmatico liscio dove si trovano altri enzimi coinvolti nella steroidogenesi. Interessanti studi forniscono un quadro dettagliato del processo<sup>(139,140)</sup>. Esistono due percorsi possibili che conducono dal pregnenolone al testosterone: la cosiddetta  $\Delta 5$  pathway attraverso il deidroepiandrosterone e il  $\Delta 5$  androstenediolo e la  $\Delta 4$  pathway attraverso progesterone e  $\Delta 4$  androstenedione. Quale percorso o combinazione di percorsi predomini nelle cellule del Leydig equino è aspetto da chiarire. Comunque nelle cellule del Leydig del ratto predomina la  $\Delta 4$  pathway mentre nelle cellule del Leydig del coniglio viene quasi esclusivamente utilizzata la  $\Delta 5$  pathway<sup>(141)</sup>. Gli enzimi coinvolti nella steroidogenesi sono localizzati nel reticolo endoplasmatico liscio e ciò ha condotto all'evidenza di una relazione diretta e lineare tra l'area di superficie totale del reticolo endoplasmatico liscio associato alle cellule del Leydig testicolari e la loro abilità nel secernere testosterone. Questa relazione si conferma anche in altre specie<sup>(141)</sup>. L'LH stimola la steroidogenesi e comporta il trasporto del colesterolo dalle gocce endocellulari verso la membrana mitocondriale esterna ed anche all'interno dei mitocondri comportando l'esposizione del colesterolo ad un enzima P450 citocromo mitocondriale che converte il colesterolo in pregnenolone in una sequenza di reazioni a tre passaggi<sup>(140)</sup>. Quindi la conversione del colesterolo in pregnenolone rappresenta il passaggio limitante nella produzione del

testosterone. La stimolazione da parte delle gonadotropine determina un aumento della produzione di pregnenolone e, di conseguenza, di testosterone ed estrogeni. Le cellule del Leydig contengono recettori specifici per l'LH nella loro membrana plasmatica. Il legame dell'LH con il recettore nella membrana plasmatica attiva una proteina legante la guanosina trifosfato (GTP) che a sua volta stimola l'adenilato ciclasi ed aumenta la concentrazione locale di adenosin monofosfato ciclico (cAMP)<sup>(140)</sup>. L'AMP ciclico determina la fosforilazione di specifiche proteine ed una idrolasi dell'estere del colesterolo diviene più attiva rilasciando quantità aumentate di colesterolo libero per il trasporto dai microfilamenti ai mitocondri. Poiché il processo non coinvolge la sintesi di una nuova proteina e gli enzimi coinvolti nella conversione del pregnenolone in testosterone sono impegnati ben al di sotto della loro massima capacità le cellule del Leydig aumentano rapidamente la produzione di testosterone in risposta alla stimolazione dell'LH. Le cellule del Leydig circondano i tubuli seminiferi e questa peculiare posizione espone l'epitelio seminifero a una concentrazione di testosterone più elevata rispetto al sangue periferico. L'elevato livello di testosterone è essenziale per la normale spermatogenesi<sup>(142,143)</sup> tanto che nel ratto può essere mantenuta dal solo testosterone. Il testosterone interviene anche sulla funzionalità di tutte le ghiandole sessuali accessorie che dipendono dalla disponibilità dell'ormone nel sangue periferico<sup>(144)</sup>. In uno studio di Berndtson e colleghi del 1974<sup>(145)</sup> la concentrazione del testosterone nel plasma periferico degli stalloni era influenzato dalla stagione. Uno studio di Thompson e

colleghi<sup>(146)</sup> del 1977, che si basava su prelievi di sangue effettuati su 4 stalloni ogni due settimane per l'intera durata dell'anno, ha mostrato risultati opposti rispetto al lavoro di Berndtson e colleghi<sup>(145)</sup> e a quello di Wiesner and Kirkpatrick<sup>(147)</sup> del 1975. La concentrazione media di testosterone nel siero di questi soggetti non variava nel tempo ( $p > 0.05$ ) e si riscontrava una variazione considerevole nell'andamento del testosterone nei singoli stalloni. Solo due dei 4 cavalli mostravano l'andamento stagionale atteso. Le concentrazioni medie di testosterone in questi stalloni variavano tra 0.7 ng/ml a dicembre e 4.1 ng/ml ad agosto. McDonnell nel 1995<sup>(148)</sup> ha valutato le concentrazioni di testosterone rapportandole ai fattori gestionali durante la stagione riproduttiva. In un primo esperimento venivano prelevati campioni di sangue giugulare di 16 stalloni adulti per la misurazione del testosterone plasmatico durante la stagione di monta immediatamente prima e 10 minuti dopo la visione di una cavalla ruffiana, appena prima e subito dopo un prelievo di seme e prima dell'inizio e alla conclusione di una settimana di prelievi giornalieri accompagnati dallo stimolo sessuale di 10 minuti di una cavalla ruffiana. Nel corso dei dieci minuti di contatto con la cavalla si osservava un incremento delle concentrazioni di testosterone del 32%, incremento significativo. Si osservava un incremento dell'11%, anch'esso significativo, nel campione giugulare successivo al prelievo seminale accompagnato anche in questo caso dalla presenza di una cavalla ruffiana. Nel terzo caso, dove si partiva da una condizione di riposo sessuale e venivano effettuati prelievi giornalieri per 5 giorni consecutivi, il testosterone

presentava un aumento delle concentrazioni plasmatiche in media del 522% e con una significatività notevole ( $p < 0.0001$ ). Per tutti i 16 stalloni il quadro si accompagnava ad un aumento della libido. In parallelo sono state valutate le concentrazioni di testosterone di 26 stalloni per il follow-up clinico. Le concentrazioni aumentavano da una media di 0.98 ng/ml nei campioni precedenti il prelievo seminale a una media di 1.11 ng/ml nei campioni ottenuti 5 minuti dopo l'eiaculazione con un incremento medio del 28% ( $p < 0.01$ ). Un secondo esperimento dello stesso ricercatore su 6 stalloni adulti ha valutato le differenze in termini di concentrazione di testosterone su stalloni scuderizzati in presenza di sole fattrici o di soli stalloni ed ha riscontrato livelli notevolmente superiori nel primo gruppo rispetto al secondo. Lo stesso autore evidenziava che su 3 soggetti con scarsa libido e bassi livelli di testosterone il contatto visivo costante con cavalle determinava dopo due settimane un incremento del 529% nelle concentrazioni di testosterone. L'autore concludeva che, alla luce dei problemi derivanti dal trattamento ormonale su stalloni ipofertili, modificare la gestione dello stallone e soprattutto il suo ambiente sociale dovrebbe essere considerato un primo approccio terapeutico. Uno studio successivo del 1997 di Lang e collaboratori<sup>(149)</sup> su 8 stalloni pony ha valutato l'effetto della somministrazione prolungata di estrogeni sulle caratteristiche seminali ed ormonali dei soggetti. Sono stati costituiti due gruppi di stalloni, uno sottoposto ad iniezioni di soluzione salina fisiologica (C, gruppo di controllo) mentre l'altro iniezioni di estrogeni a giorni alterni per un periodo di 90 giorni (ECP, gruppo

trattamento). Il prelievo per il dosaggio dei principali ormoni avveniva appena prima dell'iniezione degli estrogeni. Il testosterone presentava valori superiori nel gruppo dei soggetti trattati ( $p < 0.05$ ) e una scarsa correlazione con l'età ( $r = 0.004$ ). Di seguito vengono riportati i valori per periodo:

Period	LH		T		E <sub>2</sub>	
	ECP	C	ECP	C	ECP	C
Pre	1.69±0.33	1.69±0.24	0.89±0.14	<b>0.15±0.03</b>	152.8±15.1	372.6±134.2
1	3.04±0.49	2.12±0.23	0.90±0.08	<b>0.17±0.03</b>	205.7±12.1	251.8±62.7
2	3.35±0.67	2.56±0.30	0.81±0.06	<b>0.19±0.04</b>	241.2±16.4	185.1±39.4
3	4.44±1.04	3.32±0.54	0.84±0.07	<b>0.21±0.03</b>	275.5±30.4	166.0±50.2
4	3.98±0.67	3.61±0.69	0.90±0.07	<b>0.22±0.03</b>	239.0±18.0	100.7±16.7
5	3.92±0.61	3.46±0.85	1.04±0.09	<b>0.20±0.02</b>	247.0±15.8	81.0±15.0
6	3.92±0.53	3.45±0.44	0.95±0.11	<b>0.23±0.03</b>	254.9±16.8	61.5±7.2
7	4.65±0.98	3.03±0.37	1,02±0,09	<b>0.19±0.03</b>	237,6±13.9	67.1±7.5
8	5.59±1.48	3.16±0.41	1.00±0.09	<b>0.18±0.03</b>	225.2±10.8	59.4±10.7
9	6.15±1.64	3.75±0.65	1.19±0.09	<b>0.23±0.02</b>	249.0±13.5	64.6±13.4

Nello stesso anno Squires e colleghi<sup>(150)</sup> hanno valutato l'azione dell'altrenogest sui principali parametri riproduttivi e sugli ormoni LH e testosterone di 20 stalloni tra giugno 1993 e marzo 1994. Nello studio veniva utilizzato un gruppo di controllo e altri 4 gruppi caratterizzati da protocolli di trattamento con altrenogest differenti. I prelievi dalla vena giugulare venivano effettuati a distanza di un'ora dalle 9.00 alle 14.00 nei giorni 8, 51, 91, 151, 152, 158, 170, 185, 201, 215 e 241 dall'inizio del trattamento. Nel gruppo di controllo le concentrazioni diminuivano in autunno ( $p < 0.05$ ) e aumentavano significativamente alla fine dello studio nel mese di marzo. Le concentrazioni di testosterone nei gruppi che ricevevano altrenogest diminuivano significativamente ( $p < 0.05$ ) a partire dal giorno 51 di trattamento ma non incrementavano dopo la conclusione del trattamento. Successivamente uno studio di Hoffmann e Landeck<sup>(151)</sup> si è basato su 11 stalloni Sella tra 3 e 22 anni di età. Gli stalloni venivano prelevati ogni due settimane fino al mese di febbraio e successivamente una volta al mese tra le 9.00 e le 11.00 am. I prelievi ematici per i dosaggi ormonali venivano effettuati prima dei prelievi e comprendevano valutazioni su estrone, estrone solfato, estradiol-17 $\beta$  e testosterone. Il testosterone risultava essere lo steroide libero maggiormente presente in circolo e, al pari degli altri ormoni, seguiva un andamento stagionale con le concentrazioni più elevate nel periodo tra aprile e luglio. Un recente lavoro di

Raeside e collaboratori<sup>(152)</sup> su stalloni purosangue ha cercato di correlare le concentrazioni plasmatiche degli steroidi con la fertilità. Sono stati effettuati più di 600 prelievi per la valutazione di estrone solfato e testosterone su 72 stalloni raggruppati per classi di età. Per ogni stallone sono stati effettuati 3 prelievi (lunedì, mercoledì e venerdì) l'ultima settimana di febbraio, 3 a fine aprile ed altri 3 prelievi a metà giugno per un totale di 9 campioni. Tuttavia non è stata riscontrata una stretta correlazione tra i dosaggi ormonali e il numero di monte per ottenere una gravidanza. Veniva a tal proposito sottolineato che un grosso limite era rappresentato dalla mancanza di dati sulla percentuale di gravidanza per ciclo e che sarebbe più corretto valutare il dosaggio ormonale in relazione alla fertilità di quel determinato momento espressa in termini di percentuale di gravidanza per ciclo. Di recente uno studio effettuato in Italia da Veronesi e colleghi<sup>(153)</sup> su 14 stalloni tra 5 e 15 anni di età ha cercato di determinare gli effetti dello stimolo sessuale sulle concentrazioni plasmatiche di vari ormoni tra cui ossitocina, vasopressina, un metabolita della prostaglandina F<sub>2α</sub>, l'ormone luteinizzante, l'estrone solfato, il cortisolo ed il testosterone. I campioni di sangue sono stati prelevati durante la mattina attraverso un catetere posizionato almeno un'ora prima e 15, 12, 9, 6 e 3 minuti prima della presentazione di una cavalla in calore, al momento dell'erezione e durante l'eiaculazione oltre che 3, 6 e 9 minuti dopo l'eiaculazione e ogni 10 minuti durante i successivi 60 minuti nel box. Le concentrazioni di testosterone erano in media di 2.1±1.89 ng/mL.

Tra gli altri ormoni le concentrazioni medie di estradiolo aumentavano

rapidamente i minuti successivi all'erezione (da  $142.5 \pm 47.77$  ng/mL a  $195.3 \pm 93.34$  ng/mL e  $P < 0.05$ ) per poi ritornare ai livelli precedenti la monta nel giro di 30 minuti. Le concentrazioni di cortisolo aumentavano in maniera significativa 20 minuti dopo l'erezione (da  $17.5 \pm 3.78$  ng/mL a  $20 \pm 5.02$  ng/mL e  $P < 0.05$ ) e rimanevano a livelli elevati per i successivi 20 minuti. Nello studio è stata riscontrata una correlazione negativa tra cortisolo e testosterone prima dell'erezione e al momento dell'erezione e gli autori collegavano la cosa con il possibile ruolo inibitorio esercitato dal cortisolo nel meccanismo dello stimolo sessuale dell'uomo.

## Estrogeni

I testicoli dello stallone producono una grande quantità di estrogeni rispetto alla maggior parte delle specie<sup>(301)</sup>. Sebbene in altre specie esercitino un'azione sia negativa sia positiva sull'ipotalamo<sup>(92,154)</sup>, il loro meccanismo di azione a livello ipotalamico nello stallone deve essere ancora studiato. Thompson e collaboratori<sup>(93)</sup> hanno dimostrato che il trattamento con estradiolo diminuisce i livelli in circolo dell'FSH, aumenta i livelli di LH e diminuisce la secrezione di FSH indotta dal GnRH nei soggetti castrati da tempo. Thompson e Honey<sup>(155)</sup> hanno inoltre dimostrato un ruolo dell'estradiolo sulla secrezione dell'FSH riportando che l'immunizzazione dei puledri contro l'estradiolo aumentava i livelli in circolo dell'FSH senza modificare quelli dell'LH. Questi studi non



identificano comunque la sede di azione dell'estradiolo che potrebbe agire a livello ipotalamico modificando l'ampiezza e la frequenza del GnRH e quindi la ratio LH:FSH come visto nel ratto e nei primati<sup>(156,157)</sup> o, ancora, potrebbe agire a livello ipofisario modulando direttamente il rilascio di LH ed FSH<sup>(91,154,158)</sup>.

### Inibina ed attivina

L'inibina è un membro della super famiglia dei transforming growth factor-beta<sup>(159)</sup>. È costituita di dimeri polipeptidici glicosilati che coinvolgono sub-unità legate da ponti disolforici. Le subunità sono state localizzate sia nelle cellule del Leydig sia nelle cellule del Sertoli mediante immunoistochimica in diverse specie compreso il cavallo<sup>(159-161)</sup>. Poiché nel cavallo l'inibina svolge un'azione inibente sulla sintesi dell'FSH a livello ipofisario<sup>(160-162)</sup> essa potrebbe agire in sinergia con gli estrogeni o il testosterone nel controllo della secrezione di FSH. L'ipotesi dell'azione inibente nei confronti dell'FSH è supportata dal fatto che nell'immunizzazione della cavalla verso l'inibina si osserva successivamente un aumento dei livelli dello stesso FSH<sup>(162,163)</sup> sebbene non vi siano studi sul cavallo. L'ipotesi che l'inibina sia importante per la ripresa testicolare nello stallone è supportato dal fatto che sia l'FSH sia l'inibina mostrano cambiamenti stagionali simili; l'FSH periferico e l'inibina aumentano in primavera e diminuiscono in autunno<sup>(161,164)</sup>. Il ruolo dell'inibina come fattore paracrina-autocrino in sede testicolare, come riscontrato in altre specie, suggerisce anche che l'ormone potrebbe svolgere un ruolo importante nella spermatogenesi.

L'attivina è un altro membro della superfamiglia dei transforming growth factor-beta<sup>(159)</sup>. Consiste di due sub-unità beta legate da un ponte disolfurico:  $\beta A\beta A$ ,  $\beta B\beta B$  o  $\beta A\beta B$ . Nello stallone non sono stati effettuati studi approfonditi mentre in altre specie l'attivina sembra venga stimolata dall'FSH nelle cellule del Sertoli e che agisca al livello ipofisario per favorire il rilascio dello stesso FSH<sup>(160)</sup>. Si potrebbe supporre che l'attivina si trovi anche nelle cellule somatiche testicolari dello stallone per via del fatto che le attivine come le inibine consistono di sub-unità beta che sono state individuate nelle cellule del Sertoli e nelle cellule del Leydig<sup>(161)</sup>. Entrambe le proteine possiedono attività endocrina, paracrina ed autocrina. Oltre all'attività regolatoria sull'FSH ipofisario, recettori per l'inibina e l'attivina, co-recettori e molecole di segnalazione intracellulare sono stati identificati nei vari tipi di cellule somatiche e germinali presenti nel testicolo<sup>(133)</sup>. L'evidenza indica che inibina ed attivina agiscano come fattori paracrini influenzando la steroidogenesi delle cellule del Leydig<sup>(165-167)</sup> così come la spermatogenesi<sup>(168)</sup>. Il ruolo paracrino dell'attivina appare essere inibitorio sulla steroidogenesi nelle cellule del Leydig<sup>(167)</sup>. L'attivina appare anche avere un ruolo autocrino nello stimolare la follistatina e l'inibina da parte delle stesse cellule del Sertoli<sup>(169)</sup>. Nei testicoli di ratto l'attivina ha un effetto età-dipendente sulla divisione delle cellule del Sertoli ed agisce sullo sviluppo delle cellule germinali nel maschio<sup>(170,171)</sup>. Negli uomini la misurazione dei livelli di inibina B nel circolo periferico appare essere utile come indicatore della spermatogenesi funzionale e come marker per la

fertilità maschile<sup>(172)</sup>. Nello stallone l'inibina è presente nel tessuto testicolare e le sue sub-unità sono principalmente localizzate nelle cellule del Leydig e del Sertoli<sup>(161,173)</sup>. L'osservazione che le concentrazioni di inibina intratesticolare fossero significativamente inferiori in puledri sotto l'anno di età rispetto a puledri puberi e stalloni adulti<sup>(173)</sup> suggerisce che l'inibina, e probabilmente l'attivina, giochino un ruolo locale nello sviluppo testicolare. È stato riscontrato<sup>(173)</sup> che nel plasma l'inibina, l'estradiolo e gli estrogeni coniugati presentavano livelli notevolmente inferiori rispetto all'ambito testicolare. I livelli intratesticolari di inibina tendevano ad essere inferiori negli stalloni ipofertili ed erano significativamente inferiori negli stalloni sterili suggerendo che l'inibina intratesticolare potrebbe rappresentare un marker precoce del declino della fertilità negli stalloni. Questo fenomeno è simile a ciò che è stato osservato nel circolo periferico degli uomini. Come già ricordato le concentrazioni plasmatiche di inibina B erano notevolmente inferiori negli uomini con problemi di fertilità suggerendo che l'inibina potrebbe essere un buon bio-marker per un declino della fertilità.

### Peptide 3 testicolare simile all'insulina (INSL3)

L'ormone peptidico simile alla relaxina INSL3 (in passato conosciuto come fattore simile alla relaxina, RLF) è un ormone presente in circolo nel maschio e di recente scoperta<sup>(174)</sup>. Viene prodotto quasi esclusivamente dalle cellule del

Leydig del testicolo e, negli esseri umani, i soggetti anorchidi presentano livelli non rintracciabili di questo ormone<sup>(175)</sup>. INSL3 viene sintetizzato sia dalla popolazione di cellule del Leydig fetali sia adulte ma solo quando queste hanno raggiunto il fenotipo maturo<sup>(176)</sup>. Vari studi hanno indicato che il gene *Insl3* e la proteina (INSL3) vengono espresse essenzialmente una volta che le cellule del Leydig sono mature rendendo in tal modo INSL3 un eccellente marker della differenziazione delle cellule del Leydig<sup>(176,177)</sup>. È stata utilizzata per studiare cambiamenti nella funzione testicolare negli animali a riproduzione stagionale<sup>(178,179)</sup> e durante l'invecchiamento<sup>(180)</sup> così come per identificare in maniera inequivocabile le cellule del Leydig nelle sezioni testicolari e nelle colture primarie<sup>(181)</sup>. Studi recenti sul cavallo di Klonisch e collaboratori<sup>(182)</sup> hanno identificato INSL3 ed il suo recettore LGR8 in sede testicolare. L'INSL3 equino (eINSL3) è stato identificato come marker delle cellule del Leydig nel testicolo equino pre e post-pubere. La localizzazione dei trascritti del gene *eInsl3* nelle cellule del Leydig era indipendente dalla localizzazione anatomica del testicolo sia che fosse in addome sia che fosse nello scroto. Al contrario l'attività del gene *eInsl3* nelle cellule del Leydig testicolari appariva essere ridotta nei testicoli criptorchidi nonostante la presenza di numerose cellule del Leydig. In stalloni criptorchidi non sono state identificate mutazioni né INSL3 né LGR8. È stato comunque dimostrato che, in stalloni criptorchidi unilaterali l'espressione INSL3 è sottoregolata mentre l'espressione LGR8 è sovraespressa rispetto a stalloni con testicoli discesi<sup>(182)</sup>. È ancora argomento di dibattito se il

criptorchidismo monolaterale possa influenzare la fertilità dello stallone. Comunque negli stalloni inseriti in un sistema di inseminazione artificiale la riduzione del 50% nella produzione spermatica può essere determinante nell'attribuzione del numero di cavalle. Nel testicolo equino Klonisch e collaboratori<sup>(182)</sup> hanno anche identificato l'espressione eINSL3 nonostante la presenza di marcate differenze nello stato funzionale del ciclo cellulare dell'epitelio seminifero. Comunque le differenze quantitative che sono state osservate tra testicoli post-puberi normali e pre-puberi o criptorchidi suggeriscono meccanismi regolatori che influiscono sulla produzione di INSL3 nelle cellule del Leydig testicolari. Klonisch e collaboratori<sup>(182)</sup> hanno anche dimostrato l'espressione dei trascritti del gene eLgr8 nel testicolo equino indicando che i testicoli sono un tessuto bersaglio per l'azione dell'INSL3 equina.

#### Pro-oppiomelanocortina testicolare (POMC) e $\beta$ -endorfina

POMC è un precursore proteico che contiene la sequenza per diversi peptidi biologicamente attivi tra cui adrenocorticotropina (ACTH),  $\beta$ -endorfina ed ormone stimolante i melanociti (MSH). Bardin e collaboratori<sup>(183)</sup> indicano che le cellule del Leydig potrebbero essere l'unico tipo cellulare che produca peptidi derivati dalla POMC e che è evidente che l'LH potrebbe essere coinvolto nella produzione di questi peptidi. I peptidi derivati dalla POMC svolgono azioni

differenti sulla funzione delle cellule del Sertoli. I peptidi simili all' ACTH e MSH presentano azione stimolatoria mentre la  $\beta$ -endorfina inibitoria. Negli stalloni è stato possibile individuare la  $\beta$ -endorfina mentre non è stato riscontrato il gene per l'espressione del POMC<sup>(184)</sup>.

## Ossitocina

All'ossitocina sono attribuiti ruoli endocrini e paracrini nella riproduzione del maschio. L'ossitocina ed il suo recettore sono stati individuati nei testicoli di diversi mammiferi<sup>(185)</sup>. Sembra che venga prodotta e secreta dalle cellule del Leydig ed il suo ruolo si esplica sui recettori presenti sulle cellule del Sertoli. Tale riscontro supporta il ruolo dell'ossitocina nella contrattilità delle cellule mioidi peritubulari così da favorire il transito degli spermatozoi nel lume del tubulo e la spermiazione<sup>(185)</sup>. L'ossitocina potrebbe avere un ruolo autocrino nel modulare la steroidogenesi delle cellule del Leydig<sup>(185)</sup>.

### 1.5.2 Asse ipotalamo-ipofisi-surrene

Le cellule corticotrope della pars distalis dell'ipofisi vengono stimulate dall'ormone rilasciante la corticotropina (CRH), prodotto nei neuroni presenti nel nucleo paraventricolare dell'ipotalamo, e dall'arginin vasopressina (AVP), anche conosciuta come ormone antidiuretico che deriva da una popolazione di

neuroni ipotalamici distinti da quelli che producono l'AVP accumulata nella neuroipofisi. CRH ed AVP presentano una secrezione pulsatile nel circolo portale per favorire il rilascio degli ormoni accumulati e per indurre la trascrizione nucleare per una ulteriore produzione di questi ormoni. Negli esseri umani la secrezione pulsatile del CRH aumenta durante le prime ore del mattino e conduce ad un picco del rilascio dell'ACTH due ore prima del risveglio. I recettori per CRH si ritrovano anche in tutto il sistema nervoso centrale e cordone vertebrale. Oltre al rilascio dell'ACTH la stimolazione dei recettori CRH causa stimolazione centrale, aumentata attività simpatica del sistema nervoso ed aumentata pressione sanguigna. L'ACTH di conseguenza agisce sulle cellule della zona fascicolata della corteccia surrenale per indurre la sintesi e il rilascio del cortisolo. Il rilascio del cortisolo provvede un feedback negativo per inibire il rilascio sia del CRH sia dell'AVP dai neuroni ipotalamici e l'ACTH dalle cellule corticotrope. Il risultato finale è una caratteristica diurna del rilascio del cortisolo che raggiunge il picco nella prima parte del mattino<sup>(186)</sup>. Il ruolo del CRH e dell'AVP nello stimolare il rilascio dell'ACTH varia tra le diverse specie. Nei cavalli un metodo sperimentale di cateterizzazione venosa retrograda ha permesso la raccolta del sangue venoso ipofisario da cavalli ambulatorizzati per lo studio della regolazione della secrezione dell'ACTH sotto varie condizioni<sup>(187)</sup>. Durante le prime ore del mattino (di massimo rilascio circadiano) pulsazioni di secrezione dell'ACTH sono strettamente associate al rilascio pulsatile di AVP nel circolo portale. Al contrario la concentrazione del CRH nel

sangue venoso ipofisario rimane bassa e relativamente stabile e non è correlata con la secrezione dell'ACTH. Analogamente quando i cavalli effettuavano un intenso esercizio fisico o l'osmolarità plasmatica veniva aumentata con la somministrazione di una soluzione salina ipertonica, le concentrazioni di AVP e ACTH venose ipofisarie aumentavano contemporaneamente mentre la concentrazione di CRH non cambiava. Queste osservazioni suggeriscono che l'aumento nella secrezione di AVP rappresenta lo stimolo immediato per il rilascio dell'ACTH a riposo e durante alcune situazioni. Quando l'attività di feedback negativo del cortisolo veniva ridotta mediante l'infusione di metirapone o veniva somministrata insulina per indurre ipoglicemia nei cavalli normali sia la concentrazione di AVP sia quella di CRH aumentavano nel sangue venoso ipofisario. Sebbene l'AVP rimanesse il segnale primario per il rilascio dell'ACTH l'ampiezza della secrezione di ACTH era maggiore rispetto all'aumento della concentrazione di CRH (188). Questi riscontri suggeriscono che CRH potrebbe giocare un ruolo più importante nel regolare la risposta ipofisaria (o quantomeno del rilascio dell'ACTH) allo stimolo dell'AVP. Quindi oltre all'attività antidiuretica sembra che l'AVP prodotto nei neuroni ipotalamici associati con l'adenipofisi e la neuroipofisi giochi un ruolo importante come ormone dello stress nel cavallo. Infine l'infusione dell'antagonista oppioide naloxone conduceva anch'esso all'aumento nella concentrazione di ACTH nel sangue venoso ipofisario nei cavalli ma l'incremento non era strettamente correlato con l'aumento della concentrazione di AVP o CRH. Questi ultimi



riscontri suggeriscono che gli oppioidi endogeni potrebbero avere un effetto inibitorio sul rilascio dell'ACTH<sup>(189)</sup>. Rispetto alla regolazione da parte di AVP e CRH i melanotrofi della pars intermedia sembrano essere regolati da neuroni aminergici di derivazione ipotalamica. La dopamina è il neurotrasmettitore primario rilasciato da questi neuroni secretomotori ed inibisce il rilascio degli ormoni dai melanotrofi<sup>(190,191)</sup>. La somministrazione di antagonisti della dopamina stimola il rilascio di peptidi POMC mentre gli agonisti della dopamina possono sopprimere il rilascio dell'ormone<sup>(192)</sup>. Oltre alle differenze nella regolazione ipotalamica variano gli ormoni secreti dai corticotrofi nella pars anterior e dai melanotrofi della pars intermedia. In entrambe le sedi gli ormoni prodotti derivano da un precursore peptidico, POMC, successivamente oggetto di elaborazione post-translazionale. Nella pars distalis i prodotti primari rilasciati in circolo includono ACTH,  $\beta$ -endorfine e  $\beta$ -lipotropine. Cellule nella pars intermedia inoltre processano l'ACTH in  $\alpha$ -MSH e CLIP così che ACTH a bassa immunoreattività si ritrova nelle cellule della pars intermedia sana<sup>(193)</sup>. Analogamente  $\beta$ -endorfine vengono ulteriormente processate in tre ulteriori peptidi nelle cellule della pars intermedia sana, ognuno dei quali possiede una minore bioattività oppioide rispetto al composto di partenza<sup>(194)</sup>. La fonte circadiana di rilascio dell'ACTH deriva quasi esclusivamente dai corticotrofi della pars distalis ed aumenti nella concentrazione dell'ACTH plasmatico portano ad un aumento delle concentrazioni di cortisolo in circolo. Sebbene le caratteristiche del sonno dei cavalli varino rispetto ai primati, un andamento

diurno del rilascio dell'ACTH e, di conseguenza, del cortisolo si verifica anche nei cavalli<sup>(187,195-197)</sup>. La fonte di cortisolo dura 1-2 ore ed inizia tra 2.00 e 4.00 am e risulta in un picco delle concentrazioni plasmatiche di cortisolo tra 6.00 e 9.00 am<sup>(197)</sup>. Il cortisolo in circolo è per lo più legato a cortisol-binding globulin (CBG) e possiede un'emivita tra 2 e 3 ore. Il declino della secrezione del cortisolo nella tarda mattina e fino al primo pomeriggio risulta in un nadir dell'incremento circadiano tra 6.00 pm e mezzanotte<sup>(195-197)</sup>. Inoltre il rilascio del cortisolo porta all'inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e livello sia dell'ipotalamo sia della pars distalis. Contrariamente alla pars distalis il cortisolo non sembra avere un grande effetto inibitorio sul rilascio ormonale da parte della pars intermedia<sup>(190)</sup>. Non sembra esserci un grande effetto di razza, età o sesso sulle concentrazioni di cortisolo plasmatico nei cavalli sani. Oltre all'aumento dovuto al ritmo circadiano la concentrazione di cortisolo plasmatico aumenta in risposta a stimoli stressanti tra cui digiuno, ipoglicemia, esercizio, cambi di box, anestesia e chirurgia e stati patologici<sup>(198-201)</sup>. Inoltre i cavalli hanno meno CBG nel plasma così che solo il 60-80% del cortisolo in circolo si presenta legato rispetto al 90% negli uomini<sup>(202)</sup>. Poiché solo il cortisolo libero è attivo cambiamenti nella capacità di legame del CBG dovrebbero anche essere considerati quando si valuta la risposta del cortisolo a vari stimoli esterni od interni. In un recente studio sullo stress di interazione sociale la capacità CBG diminuiva e la concentrazione plasmatica del cortisolo libero aumentava nei cavalli stressati nonostante una mancanza di cambiamento nella concentrazione

di cortisolo totale plasmatico<sup>(203)</sup>. È importante ricordare che la misurazione della concentrazione del cortisolo totale plasmatico potrebbe non riflettere completamente il rilascio di cortisolo o l'attività in condizioni di stress. In alcuni stati patologici è possibile un incremento della secrezione dei peptidi POMC della pars intermedia dell'ipofisi con il conseguente aumento secretorio di cortisolo da parte del surrene<sup>(302)</sup>. Una condizione di ipercortisolismo cronico negli equidi viene riscontrata in corso di PPID ovvero pituitary pars intermedia dysfunction<sup>(302)</sup>, uno stato patologico a decorso lentamente progressivo e che interessa principalmente soggetti anziani. Da un punto di vista clinico i tipici segni clinici associati alla PPID sono rappresentati da irsutismo, atrofia muscolare, laminite, iperidrosi, poliuria e polidipsia e debilitamento generale<sup>(302)</sup>. Nei cavalli affetti da PPID si riscontrano diverse complicazioni tra le quali infezioni secondarie, insulino-resistenza, infertilità, ritardata guarigione delle ferite e cecità<sup>(302-306)</sup>. Alla necropsia i cavalli affetti presentano iperplasia o adenoma della pars intermedia dell'ipofisi, con la presenza di numerosi macro o microadenomi privi di capsula, che esita nella compressione di strutture adiacenti con conseguente eccessiva produzione e rilascio di peptidi POMC come l' $\alpha$ -MSH,  $\beta$ -endorfine, peptidi del lobo intermedio con attività affine all'ACTH e l'ACTH stesso<sup>(306)</sup>. La PPID può interessare sia ponies sia cavalli di qualsiasi razza e non è stata riscontrata una predisposizione di sesso<sup>(302)</sup>. L'incidenza aumenta con l'età e, generalmente, i soggetti sono maggiormente colpiti a partire da 15 anni di età<sup>(302)</sup>. Tuttavia uno studio su 3100 cavalli

presentato nel 2012 ha evidenziato che la patologia si correla strettamente con casi clinici di laminite anche in soggetti giovani di 10 anni di età<sup>(307)</sup> e diversi studi hanno diagnosticato stati di PPID anche in soggetti di 7 anni<sup>(308,309)</sup>. In uno studio di Donaldson e colleghi del 2004<sup>(310)</sup> il range di età dei soggetti affetti da PPID è compreso tra 3 e 28 anni con una età media di 15.5.

### **1.5.3 INTERAZIONI TRA ASSE RIPRODUTTIVO E ASSE IPOTALAMO-IPOFISI-SURRENE**

La capacità dello stress nell'interferire con le funzioni riproduttive nell'uomo è stato da tempo riconosciuto ed evidenziato in diversi lavori<sup>(204-207)</sup>. Negli animali uno dei primi studi sul possibile effetto dello stress sulle funzioni sessuali ha analizzato il rapporto tra densità di popolazione ed efficienza riproduttiva nei roditori<sup>(208)</sup>. Di conseguenza diversi ricercatori hanno studiato gli effetti di diversi fattori di stress sull'LH e sulla secrezione di ormoni steroidei sessuali così come sul processo ovulatorio ed hanno studiato nel ratto i meccanismi attraverso cui questa alterazione avviene. Selye<sup>(209)</sup> ha osservato che lo stress è accompagnato sia da un incremento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA) sia da una diminuzione delle funzioni riproduttive, fenomeno che l'autore attribuiva alla necessità, in caso di emergenza, di preservare la funzione della corticale del surrene a discapito dell'attività gonadica. È stata dunque ipotizzata una possibile relazione tra gli ormoni dell'asse HPA e quelli dell'asse

ipotalamo-ipofisi-gonade (HPG). Perciò il corticotropin releasing factor (CRF), i peptidi derivati dalla pro-opiomelanocortina (POMC) tra cui l'ACTH e l'endorfina e i corticosteroidi della surrenale giocano un ruolo molto importante nel modulare l'effetto dello stress sulla funzione riproduttiva. Gli ormoni connessi con lo stress possono influenzare la funzione sessuale a tutti e tre i livelli dell'asse HPG: l'ipotalamo (inibendo la secrezione del GnRH), l'ipofisi (interferendo con il rilascio dell'LH indotto dal GnRH) e le gonadi (alterando l'effetto stimolatorio delle gonadotropine sulla secrezione degli steroidi sessuali). Negli esseri umani e nei roditori<sup>(210-213)</sup> esposti ad uno stress acuto si ottiene un incremento di breve durata dei livelli plasmatici di testosterone ed LH. Negli uomini cambiamenti nei livelli degli androgeni causati da esercizio fisico intenso ma di breve durata sembra causato primariamente da un'alterazione nel volume plasmatico così come da una diminuzione della frequenza della clearance metabolica piuttosto che da una vera e propria alterazione del rilascio<sup>(214-216)</sup>. La diminuita clearance metabolica si pensava risultasse da una diminuzione nel flusso ematico a livello epatico che si verifica in corso di un esercizio intenso e di breve durata<sup>(217)</sup>. Nei roditori i meccanismi responsabili per l'incrementato rilascio dell'LH non sono ben chiariti ma un'ipotesi riguarda l'effetto stimolatorio diretto dell'ACTH sui neuroni che secernono il GnRH<sup>(212)</sup>. La risposta di ratti gonadectomizzati a stimoli acuti appare meno consistente con riferimenti di rilascio transitorio aumentato<sup>(218,219)</sup>, diminuito<sup>(210)</sup> o non alterato<sup>(220,221)</sup>. Sebbene sia possibile che un incremento

iniziale modesto possa essere mascherato da grosse fluttuazioni episodiche nella secrezione basale della gonadotropina<sup>(222-224)</sup> dovrebbe essere ricordato che lo stress attiva i neuroni noradrenergici ipotalamici che a loro volta esercitano effetti stimolatori ed inibitori complessi sul rilascio del GnRH<sup>(225)</sup>. Quindi è possibile che gli steroidi sessuali presenti in circolo possano modulare la risposta dell'LH allo stress<sup>(210,219,226)</sup> probabilmente attraverso i loro effetti sui neuroni  $\alpha$ -adrenergici<sup>(227)</sup>. Lo stress prolungato, d'altro canto, è unanimemente riconosciuto inibire il rilascio dell'LH<sup>(211,220,228-235)</sup> e bloccare l'ovulazione<sup>(231,235)</sup>. Poiché lo stress attiva anche l'asse HPA sono stati effettuati sforzi atti a valutare quali ormoni, CRF, peptidi derivati dal POMC e/o corticosteroidi della surrenale, modulino l'inibizione stress-indotta delle funzioni riproduttive. Inoltre mentre la risposta immediata allo stress dipende principalmente da meccanismi centrali l'esposizione prolungata ad uno stimolo viene ulteriormente modulata dagli effetti sull'ipofisi e/o sulle gonadi da parte degli ormoni dell'asse HPA. Eleganti studi hanno evidenziato che il CRF endogeno funge da primo mediatore dell'inibizione stress-indotta delle funzioni riproduttive in particolare per via dell'aumentato rilascio del CRF in corso di stress e per la continuità anatomica dei neuroni che secernono CRF e GnRH<sup>(233,236,237)</sup>. Negli esseri umani patologie caratterizzate dal rilascio di elevati livelli di corticosteroidi in circolo sono in grado di inibire le funzioni sessuali che generalmente ritornano alla norma dopo il ripristino della normale funzionalità della surrenale. Il trattamento con elevati dosaggi di corticosteroidi esogeni spesso causa cambiamenti avversi

sull'attività dell'asse HPG<sup>(238)</sup>. Negli animali l'asportazione delle ghiandole surrenali altera i parametri riproduttivi<sup>(239)</sup> ed in particolare la secrezione dell'LH<sup>(240,241)</sup>. Inoltre le ghiandole surrenali sono necessarie per il verificarsi degli incrementi immediati di LH ed FSH post-castrazione<sup>(242,243)</sup>. Queste osservazioni hanno suggerito il coinvolgimento dei corticosteroidi corticali come regolatori delle funzioni sessuali. Nel ratto dosi farmacologiche di desametasone interferiscono con la secrezione dell'LH indotta dal GnRH<sup>(244)</sup> e, almeno in parte, gli effetti inibitori dei corticosteroidi vengono mediati a livello ipofisario<sup>(245-251)</sup>. Comunque lo stress acuto e cronico<sup>(252)</sup> non altera la risposta ipofisaria al GnRH e ratti cui erano state asportate le ghiandole surrenali rispondono allo stress prolungato con una significativa diminuzione dei livelli di LH nel plasma. Ciò suggerisce che, quantomeno nei roditori, aumentati livelli di corticosteroidi in circolo non rappresentino i soli modulatori dell'inibizione della secrezione dell'LH indotta dallo stress. Non si hanno comunque dubbi sul fatto che i corticosteroidi siano in grado di alterare la secrezione stessa del GnRH<sup>(241,242,246,253-256)</sup>. Lo stress è in grado di determinare un calo dei livelli di testosterone plasmatico ma non si hanno certezze se vi sia un'azione diretta a livello testicolare o un'effetto indiretto sull'LH. Ormoni secreti durante stati di stress possono esercitare effetti inibenti sulle gonadi in particolare attraverso un aumento della refrattarietà delle gonadi alle gonadotropine<sup>(257,258)</sup>. Le gonadi di roditori contengono recettori per i peptidi derivati dal POMC<sup>(259-261)</sup> ed anche per i corticosteroidi della surrenale<sup>(262,263)</sup>. Ovviamente ognuno di questi ormoni può

giocare un ruolo come mediatore degli effetti dello stress<sup>(264)</sup>. In uno studio<sup>(265)</sup> la somministrazione di ACTH in ratti maschi riduceva i livelli di testosterone basale attraverso una alterazione della sensibilità testicolare all'LH. Viene generalmente accettato il concetto della capacità dei corticosteroidi di intervenire direttamente a livello testicolare<sup>(204,266-268)</sup>. Gli oppioidi testicolari paiono regolare la funzione delle cellule del Leydig e svolgono un'azione inibente sulla spermatogenesi<sup>(269,270)</sup>. Tali ormoni potrebbero essere stimolati in corso di stress. A livello del sistema nervoso centrale (CNS) si ritiene che il CRF influenzi il rilascio del GnRH probabilmente tramite percorsi che coinvolgono gli oppioidi endogeni<sup>(271-274)</sup> o le catecolamine<sup>(275,276)</sup>. Tali processi a cascata sono specie specifici e, ad esempio, iniezioni di CRF non influenzano l'attività dell'asse HPG nel ratto<sup>(277)</sup> mentre diminuiscono significativamente le concentrazioni di LH nei primati<sup>(278)</sup>. Rimane da chiarire se questo è il meccanismo principale dell'inibizione dell'asse riproduttivo in corso di stress. Anche i peptidi oppioidi endogeni esercitano un ruolo inibitorio sull'asse riproduttivo agendo direttamente sui neuroni secernenti il GnRH sull'ipotalamo di ratto attraverso recettori specifici<sup>(279,280)</sup> ed, in particolare, questa azione viene svolta dalle endorfine in entrambi i sessi<sup>(281)</sup>. Il CRF è un importante regolatore della sintesi della molecola POMC a livello ipofisario e stimola il rilascio dell'endorfina: questo fatto potrebbe in parte spiegare l'interazione di questi due sistemi sull'attività dei neuroni GnRH durante condizioni di stress. Tuttavia è stato anche dimostrato un effetto diretto del CRF sui neuroni secernenti GnRH



in quanto anche in presenza di naloxone o anticorpi anti-endorfine si osservava un calo delle concentrazioni di GnRH<sup>(282)</sup>. Ciò non esclude l'azione sinergica dei due neurotrasmettitori che potrebbero anche svolgere un'azione indiretta attraverso vari sistemi neuro-recettoriali a livello ipotalamico. La regolazione dell'asse HPG coinvolge anche il sistema delle catecolamine e serotonina<sup>(283-286)</sup>. Il sistema catecolaminergico viene fortemente attivato in condizioni di stress<sup>(287)</sup> ed è riconosciuto il coinvolgimento delle catecolamine nella regolazione dell'attività dell'asse HPA. In particolare si pensa che i neuroni catecolaminergici inibiscano il CRF attraverso i recettori ipotalamici  $\alpha_2$  mentre i recettori  $\alpha_1$  e  $\beta$  attivino il rilascio di CRF attraverso i neuroni parvocellulari del nucleo para-ventricolare. Si è concordi sul fatto che l'effetto stimolatorio delle catecolamine non rappresenti il meccanismo primario coinvolto nell'alterazione dell'asse HPG. La risposta del sistema HPG agli stimoli avversi è potenzialmente bifasica con una fase stimolatoria iniziale e, se lo stress è prolungato o di sufficiente grandezza, una successiva fase inibitoria<sup>(288)</sup>. Mentre le forme di stress acuto agiscono principalmente a livello ipotalamico sul rilascio del GnRH lo stress cronico estende la refrattarietà dell'asse anche a livello ipofisario e testicolare. Uno studio di Lerman e colleghi del 1997<sup>(289)</sup> ha valutato l'effetto della somministrazione del corticosterone, principale glucocorticoide in circolo nel ratto, sulle performance riproduttive e fertilità e sulla morfologia degli organi riproduttivi dei ratti maschi. Due gruppi di ratti venivano sottoposti ad iniezioni giornaliere di 10 o 25 mg/kg per 43-46 giorni e

un terzo gruppo riceveva un coadiuvante del farmaco (gruppo di controllo). Alla conclusione del trattamento venivano effettuati prelievi per il dosaggio dell'LH, testosterone e corticosterone. Lo studio ha evidenziato alla fine del periodo di somministrazione del corticosterone un incremento, correlabile al trattamento, nella concentrazione sierica del testosterone. Le differenze con il gruppo di controllo non erano così evidenti dopo il periodo di ricovero. Gli autori ipotizzavano che la diminuita fertilità evidenziata nel lavoro potesse essere dovuta ad un effetto del corticosterone sulla composizione e/o volume del fluido seminale che condurrebbe ad un effetto negativo sulla capacità fertilizzante degli spermatozoi. Lo studio conferma i riscontri di un precedente studio<sup>(290)</sup> che si basava sulla somministrazione del corticosterone per un periodo di tempo più breve, 29 giorni. In diversi studi<sup>(290,291)</sup> è stato tuttavia sottolineato che l'effetto del corticosterone sugli organi sessuali accessori dipende da un'azione inibente sulla secrezione dell'LH che, conseguentemente, determina un calo del testosterone. Il lavoro di Lerman e collaboratori non ha tuttavia riscontrato alterazioni evidenti delle concentrazioni di LH mentre il testosterone sierico era addirittura aumentato e gli autori avanzavano l'ipotesi che il corticosterone venisse convertito in sede epatica in testosterone come già dimostrato in un altro studio<sup>(292)</sup>. Lerman e colleghi sottolineavano la reversibilità dell'effetto del corticosterone come evidenziato una volta cessato il trattamento. Altri ricercatori hanno evidenziato diversi effetti su testicoli, epididimo e spermatogenesi a seguito della somministrazione di glucocorticoidi. La somministrazione cronica

di elevate dosi di cortisone su ratti inibiva in uno studio la spermatogenesi nei soggetti immaturi mentre non causava effetti significativi nei soggetti adulti enfatizzando il ruolo dell'età<sup>(293)</sup>. Comunque uomini che ricevevano 30 mg di prednisolone per 30 giorni presentavano un calo del numero degli spermatozoi con una concentrazione iniziale tra 42 e 56.4 milioni/ml ed un calo sino ad una concentrazione al di sotto di 10 milioni/ml<sup>(293)</sup>. Anche la motilità spermatica subiva un calo dall'80-90% ad un valore del 20%. Dall'esame bioptico dei testicoli si evidenziava un arresto della spermatogenesi, generalmente allo stadio di spermatide. Tali cambiamenti non si sono verificati in uomini che hanno ricevuto dosi inferiori, 10 mg, di prednisolone<sup>(293)</sup>. Una review di Gordon Baker del 1998<sup>(294)</sup> ha elencato i disturbi in grado di determinare effetti patologici sull'apparato riproduttore. Tra le patologie elencate hanno meritato attenzione la sindrome di Cushing, i tumori ormono-secerenti a carico della ghiandola surrenale e la somministrazione di corticosteroidi. In tali stati patologici si verificavano casi di ginecomastia ed anomalie nei parametri seminali<sup>(293)</sup>. In altri studi è stata evidenziata una riduzione dei livelli delle gonadotropine, della loro frequenza di pulsazione e capacità di risposta al GnRH<sup>(295,296)</sup>. Risultava inoltre ridotta la produzione a livello epatico della sex hormone binding globulin (SHBG) e, sempre per effetto dei glucocorticoidi, un calo proporzionale della produzione di testosterone. La somministrazione di prednisolone ad un dosaggio di 50 mg al giorno per un periodo compreso tra 2 e 6 mesi a soggetti affetti da autoimmunità spermatica determinava una diminuzione di circa il 25% nei

livelli di SHBG, testosterone ed estradiolo<sup>(297)</sup>. Nel lavoro di Baker del 1998<sup>(294)</sup> si sottolineavano gli effetti negativi sulla libido ed il verificarsi di disfunzioni erettili oltre ad una ripresa della funzionalità riproduttiva una volta ristabilizzati i livelli di glucocorticoidi in circolo. Una successiva review di Wingfield e Sapolsky del 2003<sup>(298)</sup> ha analizzato l'effetto dello stress sull'asse riproduttivo nell'uomo. Lo studio sottolineava la capacità di alcune sub-popolazioni nell'adattarsi, quantomeno nel breve periodo, a condizioni di stress ambientale e tale adattamento veniva interpretato su logiche evoluzionarie. Veniva evidenziato che, nonostante un calo dei livelli di testosterone in circolo, non si verificavano degli effetti avversi particolarmente marcati sulla fertilità maschile. Ben più limitante era considerato l'effetto negativo sulla funzione erettile a causa dallo stress e mediato da uno scompenso del sistema nervoso autonomo. Un recente studio di Welsh e colleghi del 2006<sup>(299)</sup> ha valutato gli effetti del desametasone sulle concentrazioni sieriche e testicolari del cortisone negli stalloni. Lo studio ha interessato 6 stalloni di razza Quarter Horse su cui sono stati effettuati prelievi ematici giornalieri per 10 giorni prima di due iniezioni di desametasone al dosaggio di 0.1 mg/kg peso vivo. I prelievi giornalieri per il dosaggio del cortisolo e del testosterone si sono prolungati per i successivi 14 giorni. Lo studio ha evidenziato un calo statisticamente significativo del testosterone nei soggetti sottoposti a trattamento ed ha posto l'accento sul fatto che il dosaggio del farmaco non si discosta dall'utilizzo terapeutico del farmaco in condizioni cliniche. Del resto un precedente studio di Danek del 2004<sup>(300)</sup> su

tre stalloni polacchi evidenziava già che la somministrazione intramuscolare di desametasone al dosaggio di 0.069 mg/kg di peso corporeo riduceva la concentrazione sierica del testosterone aumentando, tra l'altro, la percentuale di spermatozoi anomali e con distacco della testa.

1. Johnson L. Spermatogenesis. In: Cupps PT (ed) *Reproduction in Domestic Animals*, 4th edn. New York: Academic Press, 1990; pp. 173-219.
2. Johnson L. and Tatum M.E. Sequence of seasonal changes in numbers of Sertoli, Leydig and germ cells in adult stallions. In: *Proceedings of the Eleventh International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, vol. 3, 1988, pp. 373-4.
3. Johnson L. and Thompson Jr D.L. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol Reprod* 1983;29:777-89.
4. Johnson L., Varner D.D., Tatum M.E. and Scrutchfield W.L. Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. *Biol Reprod* 1991;45:404-10.

5. Berndtson W.E., Igboeli G. and Parker W.G. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. *Biol Reprod* 1987;37:60-7.
6. Hochereau-de Reviers M.T., Monet-Kuntz C. and Courot M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;34:101-14.
7. Tung K.S.K., Teusher C. and Meng A.L. Autoimmunity to spermatozoa and testis. *Immunol Rev* 198;55:217-55.
8. De Kresta D.M. and Kerr J.B. The cytology of the testis. In: Knobil E. and Neill J. (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988; pp. 837-932.
9. Bardin C.W., Chang C.Y., Musto N.A. and Gonsalvus G.L. The Sertoli cell. In Knobil E. and Neill J. (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988; pp. 933-74.
10. Purvis K. and Hansson V. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl Suppl* 1981;3:81-143.
11. Wright W.W. Intragonadal control of testis function. In: *Medically assisted contraception*. Washington, DC: National Academy Press, 1989;pp. 191-210.

12. Belvé A.R. The molecular biology of mammalian spermatogenesis. *Oxf Rev Reprod Biol* 1979;1:159-261.
13. Russell L.D. and Peterson R.N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil* 1984;70:635-41.
14. Courot M., Hochereau de Reviers M.T., Manet-Kuntz C., Locartelli A., Pisselet C., Blanc M.R. and Dacheux J.L. Endocrinology of spermatogenesis in the hypophysectomized ram. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;26:165-73.
15. Johnson L. and Thompson jr D.L. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *J Reprod Fertil* 1987;81:227-32.
16. Berndtson W.E., Desjardins C and Ewing L.L. Inhibition and maintenance of spermatogenesis in rats implanted with polydimethylsiloxane capsules containing various androgens. *J Endocrinol* 1974;62:125-35.
17. Amann R.P. and Ganjam V.K. Effects of hemicastration or hCG treatment on steroids in testicular vein and jugular vein blood of stallions. *J Androl* 1981;2:132-9.

18. Seamans M.C., Roser J.F., Linford R.L., Liu I.K.M. and Hughes J.P.  
Gonadotrophin and steroid concentrations in jugular and testicular venous plasma in stallions before and after GnRH injection. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:57-67.
19. Setchell B.P. *The Mammalian Testis*. Ithaca: Cornell University Press, 1978.
20. Setchell B.P. and Brooks D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil E. and Neill J. (eds). *The physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988; pp. 753-836.
21. Silberzhan P., Zwain I., Guerin P., Benoit E., Jouany J.M. and Bannaire Y.  
Testosterone response to human chorionic gonadotropin injection in the stallion. *Equine Vet J* 1988;20:61-3.
22. Bedrak E. and Samuels L.T. Steroid biosynthesis by the equine testis. *Endocrinology* 1969;85:1186-95.
23. Gaillard J.L. and Silberzhan P. Aromatization of 19-norandrogens by equine testicular microsomes. *J Biol Chem* 1987;62:5717-22.
24. Ganjam V.K. Episodic nature of the  $\Delta^4$ -ene and  $\Delta^5$ -ene steroidogenic pathways and their relationship to the adrenogonadal axis in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:67-71.



25. Lindner H.R. Androgens and related compounds in the spermatic vein blood of domestic animals. IV. Testicular androgens in the ram, boar and stallion. *J Endocrinol* 1961;23:171-8.
26. Raeside J.I. Seasonal changes in the concentration of estrogens and testosterone in the plasma of the stallion. *Anim Reprod Sci* 1979;1:205-12.
27. Ewing L. and Brown B.L. Testicular steroidogenesis. In: Johnson A.D. and Gomes W.R. (eds). *The Testis*, vol. 4. New York: Academic Press, 1977; pp. 239-87.
28. Hall P.F. testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: Knobil E. and Neill J. (eds). *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1988; pp. 975-98.
29. Clay C.M. influences of season and artificial photoperiod on reproduction in stallions. PhD thesis, Fort Collins, Colorado State University, 1988.
30. Saacke R.G. and Almquist J.O. Ultrastructure of bovine spermatozoa. II. The neck and tail of normal, ejaculated sperm. *Am J Anat* 1964,115:163-84.

31. Johnson L., Amann R.P. and Pickett B.W. Maturation of equine epididymal spermatozoa. *Am J Vet Res* 1980;41:1190-6.
32. Garner D.L. and Hafez E.S.E. Spermatozoa. In: Hafez E.S.E. (ed.). *Reproduction in Farm Animals*, 4th edn. Philadelphia: Lea & Febiger, 1980; 167-88.
33. Johnson L., Amann R.P. and Pickett B.W. Scanning electron and light microscopy of the equine seminiferous tubule. *Fertil Steril* 1978; 29:208-15.
34. Johnson L., Amann R.P. and Pickett B.W. Scanning electron microscopy of the epithelium and spermatozoa in the equine excurrent duct system. *Am J Vet Res* 1978; 39:1428-34.
35. Leblond C.P. and Clermont Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfurous acid technique. *Am J Anat* 1952; 90:167-215.
36. Johnson L. Spermatogenesis (Animal species and humans). In: *Proceedings of the International Symposium on Gamete Physiology*, Newport Beach, CA, 1988, Serono Symposia.
37. Johnson L. Spermatogenesis. In: cupps P.T. (ed.). *Reproduction in Domestic Animals*, 4<sup>th</sup> edn. New York: Academic Press, 1991; pp. 173-219.

38. Eddy E.M. The spermatozoon. In: Knobil F and Neill J. (eds). The physiology of Reproduction. New York: raven Press, 1988; pp. 27-68.
39. Bedford J.M. and Hoskins D.D. The mammalian spermatozoon: morphology, biochemistry and physiology. In: Lamming G.E. (ed.). Marshalls Physiology of Reproduction, vol. 2, 4<sup>th</sup> edn. London: Churchill Livingstone, 1990; pp. 379-568.
40. Johnson L., Amann R.P. and Pickett B.W. Maturation of equine epididymal spermatozoa. Am J Vet Res 1980;41:1190-6.
41. Baumgartl C. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen Über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomstruktur von Pferdespermien. DMV dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, 1980.
42. Baumgartl C., Bader H., Drommer W. and Liming I. Ultrastructural alterations of stallion spermatozoa due to semen conservation. In: Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. 5, 1980, pp. 134-7.
43. Olson G.E. and Sammons D.W. Structural chemistry of outer dense fibers of rat sperm. Biol Reprod 1980;22:319-32.

44. Fawcett D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell. In: Hamilton D.W. and Greep R.O. (eds). Handbook of Physiology, vol. 5, section 7. Washington, DC.: American Physiology Society, 1975; pp. 21-55.
45. Small M.F. Sperm wars. Discover 1991;48-53.
46. Barth A.D. and Oko R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989.
47. Watson P.F. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Lamming G.E. (ed.). Marshall's Physiology of Reproduction, vol. 2, 4<sup>th</sup> edn. London: Churchill Livingstone, 1990; pp. 747-869.
48. Parks J.E. and Lynch D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. Cryobiology 1992;29:255-66.
49. Pickett B.W., Squires E.L. and McKinnon A.O. Procedures for Collection, Evaluation and Utilization of Stallion Semen for Artificial Insemination. Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 03. Fort Collins, Colorado State University, 1987.
50. Amann R.P. and Pickett B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. J Equine Vet Sci 1987;7:145-73.

51. Mann T. Metabolism of semen: fructolysis, respiration and sperm energetics. In: Mann T (ed.). The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. New York: barnes and Noble, 1964, pp. 265-307.
52. Swierstra E.E., Gebauer M.R. and Pickett B.W. Reproductive physiology of the stallion. I. Spermatogenesis and testis composition. J Reprod Fertil 1974;40:113-23.
53. Johnson L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. Biol Reprod 1985;32:1181-90.
54. Johnson L. seasonal differences in equine spermatocytogenesis. Biol Reprod 1991;44:284-91.
55. Amann R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. J Androl 1981;2:37-58.
56. Hochereau-de Reviers M.T. Control of spermatogonial multiplication. In: McKerns K.W. (ed.) Reproductive Processes and Contraception. New York: Plenum Press, 1981; pp. 307-31.
57. Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anat Rec 1978;190:905-26.

58. Courot M., Hochereau-de Reviers M.T. and Ortavant R. Spermatogenesis.  
In: Johnson A.D., Gomes W.R. and VanDemark N.L. (eds). The Testis, vol. I.  
New York: Academic Press, 1970; pp. 339-442.
59. Johnson L., Amann R.P. and Pickett B.W. Scanning electron microscopy of  
the epithelium and spermatozoa in the equine excurrent duct system.  
Am J Vet Res 39:1428-1434, 1978.
60. Lopez M.L., de Souza W. and Bustos-Obregon E. Cytochemical analysis of  
the anionic sites on the membrane of the stallion spermatozoa during  
the epididymal transit. Gamete Res 1987;18:319-32.
61. Amann R.P. Function of the epididymis in bulls and rams. J Reprod fertil  
Suppl 1987;34:115-31.
62. Amann R.P. Maturation of spermatozoa. In: Proceedings of the  
International Congress of Animal Reproduction and Artificial  
Insemination, vol. 5, 1988, pp. 320-8.
63. Hamilton D.W. Structure and function of the epithelium lining the ductus  
efferentes, ductus epididymidis, and ductus deferens in the rat. In:  
Hamilton D.W. and Greep R.O. (eds). Handbook of Physiology, vol. 5,  
section 7. Washington DC: American Physiology Society, 1975; pp. 259-  
301.

64. Orgebin-Crist M.C., Danzo B.J. and Davies J. Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. In: Hamilton D.W. and Greep R.O. (eds). Handbook of Physiology, vol. 5, section 7. Washington DC: American Physiology Society, 1975; pp. 319-38.
65. Robaire B. and Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E. and Neill J. (eds). The physiology of Reproduction. New York: Raven Press, 1988; pp. 999-1080.
66. Glover T.D. and Nicander L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. J Reprod Fertil Suppl 1971;13:39-50.
67. Cooper T.G. The epididymis, Sperm Maturation and Fertilization. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
68. Nicander L. Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymis in stallions, rams and bulls. Acta Morphol Neerl Scand 1957;1:337-62.
69. Barker C.A.V. and Gaudier J.C.C. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. Can J Comp Med Vet Sci 1957;21:47-51.

70. Swierstra E.E., Pickett B.W. and Gebauer M.R. Spermatogenesis and duration of transit of spermatozoa through the excurrent ducts of stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:53-7.
71. Amann R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 1981;2:37-58.
72. Amann R.P., Thompson Jr D.L., Squires E.L. and Pickett B.W. Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:1-6.
73. Gebauer M.R., Pickett B.W. and Swierstra E.E. Reproductive physiology of the stallion. III. Extra-gonadal transit time and sperm reserves. *J Anim Sci* 1974;39:737-42.
74. Amann R.P., Kavanaugh J.F., Griel Jr L.C. and Voglmayr J.K. Sperm production of Holstein bulls determined from testicular spermatid reserves, after cannulation of rete testis or vas deferens, and by daily ejaculation. *J Dairy Sci* 1974;57:93-9.
75. Lino B.F. and Braden A.W.H. The output of spermatozoa in rams. I. Relationship with testicular output of spermatozoa and the effect of ejaculations. *Aust J Biol Sci* 1972;25:351-8.



76. Cupps P.T. *Reproduction in Domestic Animals*, 4<sup>th</sup> edn. New York: Academic Press, 1990.
77. Waites G.M.H. and Setchell B.P. *Physiology of the testis*. In: Lamming G.E. (ed.). *Marshall's Physiology of Reproduction*, 4th edn. London: Churchill Livingstone, 1981; pp. 1-105.
78. Clay C.M., Squires E.L., Amann R.P. and Nett T.M. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone. *J Anim Sci* 1988;66:1246-55.
79. Irvine C.H.G., Alexander S.L. and Turner J.E. Seasonal variation in the feedback of sex steroid hormones on serum LH concentrations in the male horse. *J Reprod Fertil* 1986;76:221-30.
80. Thompson Jr D.L., Johnson L., St. George R.L. and Garza Jr F. Concentrations of prolactin, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in pituitary and serum of horses: effect of sex, season and reproductive state. *J Anim Sci* 1986;63:854-60.
81. Thompson Jr D.L., St. George R.L., Jones L.S., Garza Jr F. Patterns of secretion of luteinizing hormone, follicle stimulating hormone and testosterone in stallions during the summer and winter. *J Anim Sci* 1985;60:741-8.

82. Hoyer J. The effect of testosterone on reproductive function in stallions.  
MS thesis, Fort Collins, Colorado State University, 1978.
83. Thompson Jr D.L., Pickett B.W., Squires E.L. and Nett T.M. Effect of testosterone and estradiol-17 $\beta$  alone and in combination on LH and FSH concentrations in blood serum and pituitary of geldings and in serum after administration of GnRH. *Biol Reprod* 1979;21:1231-7.
84. Clay C.M., Squires E.L., Amann R.P. and Nett T.M. Influences of season and artificial photoperiod on stallions: Pituitary and testicular responses to exogenous GnRH. *J Anim Sci* 1988;67:763-70.
85. Irvine C.H.G., Alexander S.L. and Hughes J.P. Sexual behavior and serum concentrations of reproductive hormones in normal stallions. *Theriogenology* 1985;23:607-17.
86. Naden J., Amann R.P. and Squires E.L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behavior in stallions. *J Reprod Fertil* 1990;88:167-76.
87. Naden J., Squires E.L., Nett T.M. and Amann R.P. Effect of maternal treatment with altrenogest on pituitary response to exogenous GnRH in pubertal stallions. *J Reprod Fertil* 1990;88:177-83.

88. Squires E.L., Todter G.E., Berndtson W.E. and Pickett B.W. Effect of ejaculation on systemic levels of testosterone and LH in stallions. In: Proceedings of the Annual Meetings of the American Society of Animal Science, 1977, p. 210.
89. Thompson Jr D.L., Pickett B.W. and Nett T.M. Effect of season and artificial photoperiod on levels of estradiol-17 $\beta$  and estrone in blood serum of stallions. J Anim Sci 1978;47:184-7.
90. Lacroix A., Gamier D.H. and Pelletier J. Temporal fluctuations of plasma LH and testosterone in Charolais bull calves during the first year of life. Ann Biol Anim Biochim Biophys 1977;17:1013-19.
91. Muyan M., Roser J.F., Dybdal N. and Baldwin D.M. Modulation of gonadotropin-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in cultured male equine anterior pituitary cells by gonadal steroids. Biol Reprod 1993;49:340-5.
92. Tilbrook A.J. and Clarke I.J. Negative feedback regulation of the secretion and actions of gonadotropin-releasing hormone in males. Biol Reprod 2001;64:735-42.
93. Thompson Jr D.L., Pickett B.W., Squires E.L. and Nett T.M. Effect of testosterone and estradiol-17 $\beta$  alone and in combination on LH and FSH

- concentrations in blood serum and pituitary geldings and in serum after administration of GnRH. *Biol Reprod* 1979;21:1231-7.
94. Garcia Jr F. et al. Active immunization of intact mares against gonadotropin releasing hormone: differential effects on secretion of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone. *Biol Reprod* 1986;35:347-52.
95. Ben-Jonathan N., LaPensee C.R. and LaPensee E.W. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 2008;29:1-41.
96. Bachelot A. and Binart N. reproductive role of prolactin. *Reproduction* 2007;133:361-9.
97. Jedlinska M., Rozewiecka I. and Ziecik A.J. Effect of hypoprolactinaemia and hyperprolactinaemia on LH secretion, endocrine function of testes and structure of seminiferous tubules in boars. *J Reprod Fertil* 1995;103:265-72.
98. Regisford E.G.C. and Katz L.S. Effects of bromocriptine-induced hyperprolactinemia on gonadotrophin secretion and testicular function in rams (*Ovis aries*) during two seasons. *J Reprod Fertil* 1993;99:529-37.
99. Hondo E., Kuromaru M., Sakai S., Ogawa K. and Hayashi Y. Prolactin receptor expression in rat spermatogenic cells. *Biol Reprod* 1995;52:1284-90.

100. Bartke A. Hyperprolactinemia and male reproduction. In: Paulson J., Negro-Vilar A., Lucena E. and Martini L. (eds). *Andrology: Male Fertility and Sterility*. New York: Academic Press, 1986; pp. 101-23.
101. Frasor J. and Gibori G. Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:118-23.
102. Thompson Jr D.L., Johnson L. and Wiest J.J. Effects of month and age on prolactin concentrations in stallion serum. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:67-70.
103. Johnson A.L. Serum concentrations of prolactin, thyroxine and triiodothyronine relative to season and the estrous cycle in the nonpregnant mare. *J Anim Sci* 1986;62:1012-20.
104. Mendis-Handagama C. and Ariyaratne S. Prolonged and transient neonatal hypothyroidism on Leydig cell differentiation in the postnatal rat testis. *Arch Androl* 2004;50:347-57.
105. Cooke P.S., Holsberger D.R., Witorsh R.J., Sylvester P.W., Meredith J.M., Treiner K.A. and Chapin R.E. Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;194:309-35.

106. Maran R.R.M. Thyroid hormones: their role in testicular steroidogenesis. Arch Androl 2003;49:375-88.
107. Meredith T.B. and Dobrinski I. Thyroid function and pregnancy status in broodmares. J Am Vet Med Assoc 2004;224:892-4.
108. Zachman M. Interrelations between growth hormone and sex hormones-physiology and therapeutics consequences. Horm Res Suppl 1992;38:1-8.
109. Chandrashekar V. and Bartke A. The role of growth hormone in pituitary and testicular function in adult mice. Endocrinology 1998;139:1067-74.
110. Spiteri-Grech J. and Nieschlag E. The role of growth hormone and insulin-like growth factor I in the regulation of male reproductive function. Horm Res Suppl 1992;1:22-7.
111. Breier B.H., Vickers M.H., Gravance C.G. and Casey P.J. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? Endocrinol J Suppl 1998;45:53-60.
112. Laron Z. and Klinger B. Effect of insulin-like growth factor-I treatment on serum androgens and testicular penile size in males with Laron syndrome (primary growth hormone resistance). Eur J Endocrinol 1998;138:176-80.

113. Kanzaki M. and Morris P.L. Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in Leydig cell progenitors. *Endocrinology* 1999;140:1681-6.
114. Shoham Z., Conway G.S., Ostergaard H., Lahlou N., Bouchard P. and Jacobs H.S. Cotreatment with growth hormone for induction of spermatogenesis in patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril* 1992;57:1044-51.
115. Aurich J.E., Kranski S. and Parvizi N. Somatostatin treatment affects testicular function in stallions. *Theriogenology* 2003;60:163-74.
116. Gerlach T. and Aurich J.E. Regulation of seasonal reproductive activity in the stallion, ram and hamster. *Anim Reprod Sci* 2000;58:197-213.
117. Aurich C., Sieme H., Hoppe H. and Schlote S. Involvement of endogenous opioids in the regulation of LH and testosterone release in the male horse. *J Reprod Fertil* 1994;102:327-36.
118. Weinbauer G.F. and Nieschlag E. Hormonal control of spermatogenesis. In: de Kretser D. (ed.) *Molecular Biology of Male Reproductive System*. New York: Academic Press, 1993; pp.99-142.
119. Huhtaniemi I. and Toppari J. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of steroidogenesis. *Adv Exp Med Biol* 1995,377:35-54.

120. Huleihel M., Lunenfeld E. and Samper J.C. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian J Androl* 2004;6:259-68.
121. Heindel J.J. and Treiner K.A. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicol Pathol* 1989;17:411-45.
122. Jegou B. and Sharpe R.M. Paracrine mechanisms in testicular control. In: de Kretser D. (ed.) *Molecular Biology of Male Reproductive System*. New York: Academic Press, 1993; pp. 271-310.
123. Skinner M.K. Secretion of growth factors and other regulatory factors. In: Russell L.D., Griswold M.D. (eds) *the Sertoli Cell*. Clearwater, FL: Cache River Press, 1993; pp. 237-47.
124. Jegou B. and Pineau C. Current aspects of autocrine and paracrine regulation of spermatogenesis. In: Mukhopadhyay A.K. and Raizada M.K. (eds) *Tissue Renin-Angiotensin Systems*. New York: Plenum Press, 1995; pp. 67-86.
125. Gnessi L., Fabbri A. and Spera G. Gonadal peptide as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. *Endocr Rev* 1997;18:541-609.



126. Holdcraft R.W. and Braun R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Int J Androl* 2004;27:335-42.
127. Spiteri-Grech J. and Nieschlag E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis-a review. *J Reprod Fertil* 1993;98:1-14.
128. Le Roy C., Lejeune H.A., Chuzel F., Saez J.M. and Langlois D. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem mol Biol* 1999;69:379-84.
129. Hull K.L. and Harvey S. Growth hormone: a reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev Reprod* 2000;5:175-82.
130. Abney T.O. The potential role of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 1999;64:610-17.
131. O'Donnell L., Robertson K.M., Jones M.E. and Simpson E.R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001;22:289-318.
132. Petersen C. and Soder O. The Sertoli cell: a hormonal target and "super" nurse for germ cells that determines testicular size. *Horm Res* 2006;66:153-61.

133. Weldt C., Sidis Y., Keutmann H. and Shneyer A. Activins, inhibins and follistatins: From endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med* 2002;227:724-52.
134. Clay C.M. Influences of season and artificial photoperiod on reproduction in stallions. PhD thesis. Fort Collins, Colorado State University, 1988.
135. Berndtson W.E., Squires E.L. and Thompson Jr D.L. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. *Theriogenology*, 20:449-457,1983.
136. Johnson L. and Thompson Jr D.L. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *J Reprod Fertil* 81:227-32, 1987.
137. Amann R.P. and Ganjam V.K. Effect of hemicastration or hCG-treatment on steroids in testicular vein and jugular vein blood of stallions. *J Androl* 2:132-139, 1981.
138. Seamans M.C. et al. Gonadotrophin and steroid concentrations in jugular and testicular venous plasma in stallions before and after GnRH injection. *J Reprod Fertil Suppl* 44:57-67, 1991.

139. Ewing L. and Brown B.L. testicular steroidogenesis. In: The testis. Vol 4. Edited by A.D. Johnson and W.R. Gomes. New York, Academic Press, 1977, pp. 239-87.
140. Hall P.F. Testicular steroid synthesis: Organization and regulation. In: the Physiology of Reproduction. Edited by Knobil E. and Neill J. New York, Raven Press, New York, 1988, pp. 975-98.
141. Zirkin B.R., Ewing L.L., Kormann N. and Cochran R.C. testosterone secretion by rat, rabbit, guinea-pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107:1867-74, 1980.
142. Courot M. et al. Endocrinology of spermatogenesis in the hypophysectomized ram. *J Reprod Fertil Suppl* 26:165-173, 1979.
143. Courot M. The effects of gonadotrophins on testicular function (spermatogenesis). *Proceedings of the International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Vol. 5. Dublin, 1988, pp. 311-19.
144. Thompson Jr D.L., Pickett B.W., Squires E.L. and Nett T.M. effect of testosterone and estradiol-17 $\beta$  alone and in combination on LH and FSH concentrations in blood serum and pituitary of geldings and in serum after administration of GnRH. *Biol Reprod* 21:1231-37, 1979.

145. Berndtson W.E., Pickett B.W. and Nett T.M. Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. J Reprod Fertil 1974; 39:115-118.
146. Thompson D.L. Jr., Pickett B.W., Berndtson W.E., Voss J.L. and Nett T.M. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behavior and concentrations of LH and testosterone in serum. Journal Of Animal Science, Vol. 44, No. 4, 1977.
147. Wiesner, L. M. and J. F. Kirkpatrick. 1975. Seasonal and diurnal testosterone in wild stallions. Proc. Eighth Annu. Meet. Soc. Study Reprod. p. 93.
148. McDonnell S.M. Stallion behavior and endocrinology: what do we really know? AAEP Proceedings Vol.41, pp. 18-19, 1995.
149. Lang A.L., Vogelsang M.M., Potter G.D., Blanchard T.L. and Harms P.G. Semen parameters and hormone concentrations in stallions subjected to long-term estrogen administration. Journal Of Equine Veterinary Science, Volume 18, Number 2, 1998.
150. Squires E.L., Badzinski S.L., Amann R.P., McCue P.M. and Nett T.M. Effects of altrenogest on total scrotal width, seminal characteristics,

- concentrations of LH and testosterone and sexual behavior of stallions. *Theriogenology* 48:313-328, 1997.
151. Hoffmann B. and Landeck A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal Reproduction Science* 57, pp. 89–98, 1999.
152. Raeside J.I., Christie H.L. and MacLeod J.N. Plasma steroid concentrations in relation to reproductive performance in Thoroughbred stallions. *Animal Reproduction Science* 121, pp 145-147, 2010.
153. Veronesi M.C., Tosi U., Villani M., Govoni N., Faustini M., Kindahl H., Madej A. and Carluccio A. Oxytocin, vasopressin, prostaglandin F2a, luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate, and cortisol plasma concentrations after sexual stimulation in stallions. *Theriogenology* 73 (2010) 460–467.
154. Fink G. The G.W. Harris Lecture. Steroid control of brain and pituitary function. *J Exp Physiol* 1988;73:257-93.
155. Thompson Jr D.L. and Honey P.G. Active immunization of prepubertal colt against estrogens: Hormonal and testicular responses after puberty. *J Anim Sci* 1984;59:189-96.

156. Barraclough C.A., Wise P.M., Turgeon J., Shander D., Depaulo L. and Range N. Recent studies on the regulation of pituitary LH and FSH secretion. *Biol Reprod* 1979;20:86-97.
157. Knobil E. The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Prog Hormone Res* 1980;36:53-88.
158. Baldwin D.M., Roser J.F., Muyan M., Lasley B. and Dybdal N. Direct effects of free and conjugated steroids on GnRH-stimulated LH release in cultured equine pituitary cells. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:327-32.
159. Loveland K.L., Dias V., Meachem S. and Raipert-De Meyts E. The transforming growth factor-beta super family in early spermatogenesis: potential relevance to testicular dysgenesis. *Int J androl* 2007;30:377-84.
160. Vale W., Bilezikjian L.M. and Rivier C. reproductive and other roles of inhibins and activins. In: Knobil E. and Neill J.D. (eds). *The Physiology of Reproduction*, 2<sup>nd</sup> edn. New York: Raven Press, 1994; pp. 1861-71.
161. Nagata S., Tsunoda N., Nagamine N., Tanaka Y., Taniyama H., Nambo Y., Watanabe G. and Taya K. Testicular inhibin in the stallion: cellular source and seasonal changes in its secretion. *Biol Reprod* 1998;59:62-8.

162. McKinnon A.O., Brown R.W., Pashen R.L., Greenwood P.E. and Vasey J.R. Increased ovulation rates in mares after immunization against recombinant bovine inhibin alpha-subunit. *Equine Vet J* 1992;24:144-6.
163. Nambo Y., Kaneko H., Nagata S., Oikawa M., Yoshihara T., Nagamine N., Watanabe G. and Taya K. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares. *Theriogenology* 1998;50: 545-57.
164. Roser J.F., McCue P. and Hoye E. Inhibin activity in the mare and stallion. *Domest Anim Endocrinol* 1994;11:87-100.
165. Hsueh A.J., Dahl K.D., Vaughan J., Tucker E., Rivier J., Bardin C.W. and Vale W. Heterodimers and monodimers of inhibin subunits have different paracrine actions in the modulation of luteinizing hormone-stimulated androgen biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:5082-6.
166. Lin T., Calkins J.K., Morris P.L., Vale W. and Bardin C.W. Regulation of Leydig cell function in primary culture by inhibin and activin. *Endocrinology* 1989;125:2134-40.

167. Lejeune H., Chuzel F., Sanchez P., Durand P., Mather J.P. and Saez J.M. Stimulating effect of both human recombinant inhibin A and activin A on immature porcine Leydig cell functions in vitro. *Endocrinology* 1997;138:4783-91.
168. Hakovirta H., Kaipia A., Soder O. and Parvinen M. Effects of activin-A, inhibin-A and transforming growth factor-beta 1 on stage specific deoxyribonucleic acid synthesis during rat seminiferous epithelial cycle. *Endocrinology* 1993;133:1664-8.
169. de Kretser D.M., Buzzard J.J., Okuma Y., O'Connor A.E., Hayashi T., Lyn S.Y., Morrison J.R., Loveland K.L. and Hedger M.P. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. *Mol Cell Endocrinol* 2004;225:57-64.
170. Boitani C., Stefanini M., Fragale A. and Morena A.R. Activin stimulates Sertoli cell proliferation in a defined period of rat testis development. *Endocrinology* 1995;136:5438-44.
171. Meehan T., Schlatt S., O'Bryan M.K., de Kretser D.M. and Loveland K.L. regulation of germ cell and Sertoli cell development by activin, follistatin, and FSH. *Dev Biol* 2000;220:225-37.



172. Kumanov P., Nandipati K., Tomova A. and Agarwal A. Inhibin B is a better marker of spermatogenesis than other hormones in the evaluation of male factor infertility. *Fertil Steril* 2006;86:332-8.
173. Stewart B.L. and Roser J.F. Effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (Ir) inhibin concentrations in stallions. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15:129-39.
174. Ivell R., Hartung S. and Anaud-Ivell R. Insulin-like factor 3: where are we now? *Ann N Y Acad Sci* 2005;1041:486-96.
175. Bay K., Hartung S., Ivell R., Schumacher M., Jurgensen D., Jorgensen N., holm M., Skakkebaek N.E. and Anderson A.M. Insulin-like factor 3 serum levels in 135 normal men and 85 men with testicular disorders: relationship to the luteinizing hormone-testosterone axis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:3410-18.
176. Balvers M., Spiess A.N., domagalski R., Hunt N., Kilic E., Mukhopadhyay A.K., Hanks E., Charlton H.M. and Ivell R. Relaxin-like factor expression as a marker of differentiation in the mouse testis and ovary. *Endocrinology* 1998;139:2960-70.

177. Sadeghian H., Anand-Ivell R., Balvers M., Relan V. and Ivell R. constitutive regulation of the Insl3 gene in rat Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005;124:10-20.
178. Ivell R., Balvers M., Anand R.J.K., Paust H.J., McKinnell C. and Sharpe R. Differentiation-dependent expression of 17 $\beta$ -HSD type 10 in the rodent testis: effect of aging in Leydig cells. *Endocrinology* 2003;144:3130-7.
179. Hombach-Klonisch S., Schon J., Kehlen A., Blottner S. and Klonisch T. Seasonal expression of INSL3 and Lgr8/Insl3 receptor transcripts indicates variable differentiation of Leydig cells in the roe deer testis. *Biol Reprod* 2004;71:1079-87.
180. Paust H.J., Wessels J., Ivell R. and Mukhopadhyay A.K. The expression of the RLF/INSL3 gene is reduced in Leydig cells of the aging rat testis. *Exp Gerontol* 2002;37:1461-7.
181. Caprio M., Fabbrini E., Ricci G., Basciani S., Gnessi L., Arizzi M., Carta A.R., De martino M.U., Isidori A.M., Frajese G.V. and Fabbri A. Ontogenesis of leptin receptor in rat Leydig cells. *Biol Reprod* 2003;68:1199-207.

182. Klonisch T., Steger K., Kehlen A., Allen W.R., Froehlich C., Kauffold J., Bergmann M. and Hombach-Klonisch S. INSL3 ligand-receptor system in the equine testis. *Biol Reprod* 2003;68:1975-81.
183. Bardin C.W., Shaha C., Mather J., Salomon Y., Margioris A.N., Liotta A.S., Gerendai I., Chen C.L. and Krieger D.T. Identification and possible function of pro-opiomelanocortin-derived peptides in the testis. *Ann N Y Acad Sci* 1984;438:346-64.
184. Soverchia L., Mosconi G., Ruggeri B., Ballarini P., Catone G., Degl'Innocenti S., Nabissi M. and Polzonetti-Magni A.M. Proopiomelanocortin gene expression and beta-endorphin localization in the pituitary, testis, and epididymis of stallion. *Mol Reprod Dev* 2006;73:1-8.
185. Thackare H., Nicholson H.D. and Whittington K. Oxytocin: its role in male reproduction and new potential therapeutic uses. *Hum Reprod Update* 2006;12:437-48.
186. Berne R.M. and Levy M.N. The hypothalamus and pituitary gland. In: *Physiology*. 4th edition. St. Louis: Mosby; 1998. p. 872–909.
187. Alexander S.L., Irvine C.H.G. and Donald R.A. Dynamics of the regulation of the hypothalamopituitary-adrenal (HPA) axis determined

- using a nonsurgical method for collecting pituitary venous blood from horses. *Front Neuroendocrinol* 1996;17:1–50.
188. Alexander S.L., Roud H.K. and Irvine C.H.G. Effect of insulin-induced hypoglycaemia on secretion patterns and rates of corticotrophin-releasing hormone, arginine vasopressin and adrenocorticotropin in horses. *J Endocrinol* 1997;153:401–9.
189. Alexander S.L. and Irvine C.H.G. The effect of naloxone administration on the secretion of corticotropin-releasing hormone, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin in unperturbed horses. *Endocrinology* 1995;136:5139–47.
190. Malven P.V. Pituitary gland neuroendocrinology. In: *Proceedings of the 15th Annual Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine*. 1997. p. 462–7.
191. Yamaguchi H., Aiba A., Nakamura K. et al. Dopamine D2 receptor plays a critical role in cell proliferation and proopiomelanocortin expression in the pituitary. *Genes Cells* 1996;1:253–68.
192. Beatty D.M., Morris S.J. and Chronwall B.M. Heterogeneity in POMC expression among explanted melanotropes decreases with time in culture and bromocriptine treatment. *Peptides* 1998;19:659–65.

193. Wilson M.G., Nicholson W.E., Holscher M.A. et al. Proopiomelanocortin peptides in normal pituitary, pituitary tumor, and plasma of normal and Cushing's horses. *Endocrinology* 1982;110:941–54.
194. Millington W.R., Dybdal N.O., Dawson R. et al. Equine Cushing's disease: differential regulation of b-endorphin processing in tumors of the intermediate pituitary. *Endocrinology* 1988;123:1598–604.
195. James V.H.T., Horner M.W., Moss M.S. et al. Adrenocortical function in the horse. *J Endocrinol* 1970;48:319–35.
196. Larsson M., Edqvist L.E., Ekman L. et al. Plasma cortisol in the horse, diurnal rhythm and effects of exogenous ACTH. *Acta Vet Scand* 1979;20:16–24.
197. Toutain P.L., Oukessou M., Autefage A. et al. Diurnal and episodic variations of plasma hydrocortisone concentrations in horses. *Domest Anim Endocrinol* 1988;5:55–9.
198. van der Kolk J.H. Diseases of the pituitary gland, including hyperadrenocorticism. In: Watson TD, editor. *Metabolic and endocrine problems of the horse*. London: WB Saunders; 1998. p. 41–59.

199. Hoffsis G.F. and Murdick P.W. The plasma concentrations of corticosteroids in normal and diseased horses. *JAVMA* 1970;157:1590–4.
200. Irvine C.H.G. and Alexander S.L. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentration in horses. *Domest Anim Endocrinol* 1994;11:317–37.
201. Messer N.T., Johnson P.J., Refsal K.R. et al. Effect of food deprivation on baseline iodothyronine and cortisol concentrations in healthy, adult horses. *AmJVet Res* 1995;56:116–21.
202. Gayrard V., Alvinirie M. and Toutain P.L. Interspecies variations of corticosteroid-binding globulin parameters. *Endocrinology* 1996;13:35–45.
203. Alexander S.L. and Irvine C.H.G. The effect of social stress on adrenal axis activity in horses: the importance of monitoring corticosteroid-binding globulin capacity. *J Endocrinol* 1998; 157:425-32.
204. Collu R., Gibb W. and Ducharme J.R. Effects of stress on the gonadal function. *J Endocrinol Invest* 1984; 7:529-537.
205. McGrady A.V. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. *Archives of Andrology* 1984; 13:1-7.

206. Rabin D., Gold P.W., Margioris A.N. and Chrousos G.P. Stress and reproduction: physiologic and pathophysiologic interactions between the stress and reproductive axes. *Adv Exp Med Biol* 1988; 245:377-387.
207. Yen S.S.C. Chronic anovulation due to CNS-hypothalamic-pituitary dysfunction. In: Yen SSC, Jaffe RB (Eds.), *Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Co.; 1986: 500-545.
208. Christian J.J. Population density and reproductive efficiency. *Biol Reprod* 1971; 4:248-294.
209. Selye H. Effect of adaptation to various damaging agents on the female sex organs in the rat. *Endocrinology* 1939; 25:615-624.
210. Euker J.S., Meites J. and Riegler G.D. Effects of acute stress on serum LH and prolactin in intact, castrate and dexamethasone-treated male rats. *Endocrinology* 1975; 96:85-92.
211. Krulich L., Hefco E., Illner P. and Read C.B. The effects of acute stress on the secretion of LH, FSH, prolactin and GH in the normal male rat, with comments on their statistical evaluation. *Neuroendocrinology* 1974; 16:293-311.

212. Mann D.R., Evans D.C., Jacobs V.L. and Collins D.C. Influence of acute intracerebro-ventricular (icy.) administration of adrenocorticotrophin (ACTH) on LH secretion in male rats: effect of pretreatment (icy.) with ACTH antiserum on the serum LH response to an acute ether stress. *J Endocrinol* 1986; 108:275-280.
213. Turpen C., Johnson D.C. and Dunn J.D. Stress-induced gonadotropin and prolactin secretory patterns. *Neuroendocrinology* 1976; 20:339-351.
214. Cumming D.C., Wall S.R., Quinnev H.A. and Belcastro A.N. Decrease in serum testosterone levels with maximal swimming exercise in trained male and female swimmers. *Endocrine Rev* 1987; 13:31-41.
215. Keiser H.A., Poortman J. and Bunnink G.S. Influence of physical exertion on sex hormone metabolism. *J Appl Physiol* 1980; 48:765-769.
216. Wilkerson J.E, Horvath S.M. and Gutin B. Plasma testosterone during treadmill exercise. *J Appl Physiol* 1980; 49:249-253.
217. Rowell L.B. Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiol Rev* 1974; 54:75-159.
218. Ajika K., Kalra S.P., Fawcett C.P., Krulich L. and McCann SM. The effect of stress and nembutal on plasma levels of gonadotropins and prolactin in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1972; 90:707-715.



219. Briski K.P. and Sylvester W. Effect of specific acute stressors on luteinizing hormone release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-treated female rats. *Neuroendocrinology* 1988; 47:194-202.
220. Blake C.A. Effects of "stress" on pulsatile luteinizing hormone release in ovariectomized rats. *Proc Soc Exper Biol Med* 1975; 148:813-815.
221. Neill J.D. Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1970; 87:1192-1197.
222. Ellis G.B. and Desjardins C. Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. *Endocrinology* 1982; 110:1618-1627.
223. Gallo R.V. Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biol Reprod* 1981; 24:771-777.
224. Gay V.L. and Sheth N.A. Evidence for a periodic release of LH in castrated male and female rats. *Endocrinology* 1972; 90:158-162.
225. Plotsky P.M., Otto R. and Sutton S. Central regulation of luteinizing hormone secretion and its modulation by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In: Genazzani AR, Montemagno U, Nappi C, Petraglia F

- (eds.), Proceedings of the First International Capri (Italy) Conference. NJ City: Parthenon Publishing Group; 1988: 291-303.
226. Seyler L.E. Jr. and Reichlin S. Luteinizing hormone release in the rat induced by blood volume depletion. *Endocrinology* 1973; 92:295-301.
227. Higuchi I., Honda K. and Negoro H. Influence of oestrogen and noradrenergic afferent neurones on the response of LH and oxytocin to immobilization stress. *J Endocrinol* 1986; 110:245-250.
228. Collu R., Tachit Y. and Ducharme J.R. Hormonal modifications induced by chronic stress in rats. *J Steroid Biochem* 1979; 11:989-1000.
229. DuRuisseau P., Tachit Y., Braseau P. and Collu R. Effects of chronic immobilization stress on pituitary hormone secretion, on hypothalamic factor levels, and on pituitary responsiveness to LHRH and TRFI in female rats. *Neuroendocrinology* 1979; 29:90-99.
230. Hagino N. Ovulation and mating behavior in female rats under various environmental stresses or androgen treatment. *Jap J Physiol* 1968; 18:350-355.
231. Hulse G.K. and Coleman G.J. The role of endogenous opioids in the blockade of reproductive function in the rat following exposure to acute stress. *Pharmacol Biochem Behav* 1983; 19:795-799.

232. Koh T., Nakai Y., Kinoshita F., Tsukada I., Tsujii S., Imura H. and Maeda K. Serotonin involvement in the inhibition of luteinizing hormone (LH) release during immobilization in castrated male rats. *Life Sci* 1984; 34:1635-1641.
233. Rivier C., Rivier J. and Vale W. Stress-induced inhibition of reproductive functions: role of endogenous corticotropin-releasing factor. *Science* 1986; 231:607-609.
234. Tache Y., DuRuisseau P., Ducharme J.R. and Collu R. Adenohypophysial hormone response to chronic stress in dexamethasone-treated rats. *Horm Rca* 1979; 11:101-108.
235. Yonetani R., Jojima M. and Suzuki Y. Blockade of ovulation in rats by forced immobilization for surgical treatment. *Endocrinology* 1974; 21:61-68.
236. Plotsky P.M. and Vale W. Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* 1984; 114:164-169.
237. MacLusky N.J., Naftolin F. and Leranth C. Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between

- corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotrophin-releasing hormone (GnRH)-containing neurons in the preoptic area of the rat. *Brain Res* 1988; 439:391-395.
238. Yen S.S.C. Chronic anovulation caused by peripheral endocrine disorders. In: Yen SSC, Jaffe RB (eds.). *Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. Philadelphia, PA. W.B. Saunders Co.; 1986: 441-499.
239. Ramaley J.A. Minireview: adrenal-gonadal interactions at puberty. *Life Sci* 1974; 14:1623-1633.
240. Lorenzen J.R., Schlepfforst C. and Schwartz N.B. The interaction of castration and adrenalectomy on pituitary responses to loss of target gland negative feedback in the male rat. *Endocrinology* 1980; 106:592-599.
241. Ogle I.F. Modification of serum luteinizing hormone and prolactin concentrations by corticotropin and adrenalectomy in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1977; 101:494-497.
242. Ringstrom S.J. and Schwartz N.B. Examination of prolactin and pituitary-adrenal axis components as intervening variables in the

- adrenalectomy-induced inhibition of gonadotropin response to castration. *Endocrinology* 1984; 114:880-887.
243. Schwartz N.B. and Justo S.N. Acute changes in serum gonadotrophins and steroids following orchidectomy in the rat: role of the adrenal gland. *Endocrinology* 1977; 100:1550-1556.
244. Rivier C. Involvement of endogenous corticotropin-releasing factor (CRF) in modulating ACTH and LH secretion function during exposure to stress, alcohol or cocaine in the rat. In: Zinder O, Bresnitz S (eds.), *Molecular Biology of Stress*. New York: Alan R. Liss, Inc.; 1989: 31-47.
245. Baldwin D.M. The effect of glucocorticoids on estrogen-dependent luteinizing hormone release in the ovariectomized rat and on gonadotropin secretion in the intact female rat. *Endocrinology* 1979; 105:120-128.
246. Baldwin D.M. and Sawyer C.H. Effects of dexamethasone on LH release and ovulation in the cyclic rat. *Endocrinology* 1974; 94:1397-1403.
247. Cohen I.R. and Mann D.R. Influence of corticosterone on the response to gonadotropin-releasing hormone in rats. *Neuroendocrinology* 1981; 32:1-6.

248. Kamel F. and Kubajak C.L. Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonads! steroids and mechanism of action. *Endocrinology* 1987; 121:561-568.
249. Rosen H., Dalkin A., Haisenleder D., Friberg R.D., Ortolano G. and Barkan A. Dexamethasone alters responses of pituitary gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors, gonadotropin subunit messenger ribonucleic acids, and gonadotropins to pulsatile GnRH in male rats. *Endocrinology* 1991; 128:654-660.
250. Rosen H., Jameel M.L. and Barkan A.L. Dexamethasone suppresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion and has direct pituitary effects in male rats: differential regulation of GnRH receptor and gonadotropin responses to GnRH. *Endocrinology* 1988; 122:2873-2880.
251. Suter D.E., Schwartz N.B. and Ringstrom S.J. Dual role of glucocorticoids in regulation of pituitary content and secretion of gonadotropins. *Amer J Physiol* 1988; 254:E595-E600.
252. Taché Y., Ducharme J.R., Charpenet G., Haour F., Saez J. and Collu R. Effect of chronic intermittent immobilization stress on hypophyseogonadal function of rats. *Acta Endocrinol* 1980; 93:168-174.

253. Belhadj H., Dc Besi L., Bardin C.W. and Thau R.B. The implication of opiates in the glucocorticoid-mediated inhibition of LH secretion in rats. *J Endocrinol* 1989; 122:451-456.
254. Ringstrom S.J. and Schwartz N.B. Cortisol suppresses the LH, but not the FSH, response to gonadotropin-releasing hormone after orchidectomy. *Endocrinology* 1985; 116:472-474.
255. Suter D.E. And Schwartz N.B. Effects of glucocorticoids on responsiveness of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone by male rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1985; 117:855-859.
256. Vreeburg J.T.M., DeGreef W.J., Ooms M.P., Wouw P.V. and Weber R.F.A. Effects of adrenocorticotropin and corticosterone on the negative feedback action of testosterone in the adult male rat. *Endocrinology* 1984; 115:977-983.
257. Charpenet G., Tache Y., Bernier M., Ducharme J.R. and Collu K. Stress-induced testicular hyposensitivity to gonadotropin in rats. Role of the pituitary gland. *Biol Reprod* 1982; 27:616-623.
258. Charpenet G., Taché Y., Forest M.G., Haour F., Saez J.M., Bernier M., Ducharme J.R. and Collu R. Effects of chronic intermittent immobilization

- stress on rat testicular androgenic function, *Endocrinology* 1981; 109:1254-1258.
259. Bardin C.W., Chen C.C., Morris P., Gerendai I., Boitani C., Lions A.S., Margioris A. and Krieger D.T. Proopiomelanocortin derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. In: Clark JH (eds), *Recent Progress in Hormone Research*. Orlando, FL: Academic Press; 1987: 1-24.
260. Li H., Risbridger G.P., Fonder J.W. and Clements J.A. Effect of ethane dimethane sulphonate on proopiomelanocortin (POMC) mRNA and POMC-derived peptides in the rat testis. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 65:203-207.
261. Valenca M.M. and Negro-Vilar A. Proopiomelanocortin-derived peptides in testicular interstitial fluid: characterization and changes in secretion after human chorionic gonadotropin or luteinizing hormone-releasing hormone analog treatment. *Endocrinology* 1986; 118:32-37.
262. Evain D., Morera A.M. and Saez J.M. Récepteurs de glucocorticoides dans le testicule de rat. *Ann d'Endocrinol* 1976; 37:101-102.
263. Saez J.M., Morera A.M., Haour F. and Evain D. Effects of in vivo administration of dexamethasone, corticotropin and human chorionic



- gonadotropin on steroidogenesis and protein and DNA synthesis of testicular interstitial cells in prepuberal rats. *Endocrinology* 1977; 101:1256-1263.
264. Fabbri A., Jannini E.A., Gnessi L., Ulisse R., Moretti C. and Isidori A. Neuroendocrine control of male reproductive function, The opioid system as a model of control at multiple sites. *J Ster Biochem* 1989; 32:145-150.
265. Mann D.R., Free C., Nelson C., Scott C. and Collins D.C. Mutually independent effects of adrenoconicotropin on luteinizing hormone and testosterone secretion. *Endocrinology* 1987; 120:1542-1550.
266. Bambino I.H. and Hsueh A.J.W. Direct Inhibitory effect of glucocorticoids upon testicular luteinizing hormone receptor and steroidogenesis in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1981; 108:2142-2148.
267. Repoekova D. and Mikulaj L. Plasma testosterone of rats subjected to immobilization stress and/or HCG administration. *Horm Res* 1977; 8:51-57.
268. Welsh T.H. Jr, Bambino I.H. and Hsueh A.J.W. Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis in vitro. *Biol Reprod* 1982; 27:1138- 1146.

269. Fabbri A., Linajero J.C. and DuFau M.L. Corticotropin-releasing factor is produced by rat Leydig cells and has a major local antireproductive role in the testis. *Endocrinology* 1990; 127:1541-1543.
270. Ulisse R., Fabbri A., Dufau M.L. Corticotropin-releasing factor receptors and actions in rat Leydig cells. *J Biol Chem* 1989; 264:2156-2163.
271. Almeida O.F.X., Nikolarakis K.E. and Herz A. Evidence for the involvement of endogenous opioids in the inhibition of luteinizing hormone by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 1988; 122:1034-1041.
272. Gindoff P.R. and Ferin M. Endogenous opioid peptides modulate the effect of corticotropin-releasing factor on gonadotropin release in the primate. *Endocrinology* 1987; 121:837-842.
273. Petraglia F., Sutton R., Vale W. and Plotsky P. Corticotropin-releasing factor decreases plasma LH levels in female rats by inhibiting gonadotropin-releasing hormone release into hypophysial-portal circulation. *Endocrinology* 1987; 120:1083-1088.

274. Petraglia F., Vale W. and Rivier C. Opioids act centrally to modulate stress-induced decrease in luteinizing hormone in the rat *Endocrinology* 1986; 119:2445-2450.
275. Butler P.D., Weiss J.M., Stout J.C. and Nemeroff C.B. Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J Neurosci* 1990; 10:176-183.
276. Valentino R.J. Corticotropin-releasing factor: putative neurotransmitter in the noradrenergic nucleus locus coeruleus. *Psychopharmacol Bull* 1989; 25:306-312.
277. Rivier C. and Vale W. Influence of corticotropin-releasing factor (CEF) on reproductive functions in the rat. *Endocrinology* 1984; 114:914-919.
278. Xiao E., Luckhaus J., Niemann W. and Ferin M. Acute inhibition of gonadotropin secretion by corticotropin-releasing hormone in the primate; are the adrenal glands involved? *Endocrinology* 1989; 124:1632-1637.
279. Rasmussen D.D., Gambacciani M., Swans W. and Tueros V.S. *Yen SSC. Pulsatile gonadotropin-releasing hormone release from the human*

- mediobasal hypothalamus in vitro: opiate receptor-mediated suppression. *Neuroendocrinology* 1989; 49:150- 156.
280. Drouva S.V., Epelbaum J., Tapia-Arancibia L., Laplante E. and Kordon C. Opiate receptors modulate LHRH and SRIF release from mediobasal hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology* 1981; 32:163-167.
281. Chen W.P., Within J.W. and Silverman A.J. Sexual dimorphism in the synaptic input to gonadotropin releasing hormone neurons. *Endocrinology* 1990; 126:695-702.
282. Sirinathsinghji D.J.S. Regulation of lordosis behaviour in the female rat by corticotropin- releasing factor,  $\beta$ -endorphin/corticotropin and luteinizing hormone-releasing hormone neuronal systems in the medial preoptic area. *Brain Res* 1986; 375:49-56.
283. Weiner R.I., Findell P.R. and Kordon C. Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. In: Knobil E, Neil J (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press; 1988: 1235-1281.
284. Barraclough C.A., Wise P.M. and Selmansoff M.K. A role for hypothalamic catecholamines in the regulation of gonadotropin secretion. *Rec Prog Horm Res* 1984; 40:487-529.

285. Ramirez D., Feder H. and Saws'er C. The role of brain catecholamines in the regulation of UI secretion: a critical inquiry. In: Martini L, Ganong W (eds.), *Frontiers in Neuroendocrinology*. New York: Raven Press; 1984: 27-84.
286. Taleisnik S. and Sawyer C.H. Activation of the CNS noradrenergic system may inhibit as well as facilitate pituitary luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology* 1986; 44:265-268.
287. Plotsky P., Cunningham E.T.J. and Widmaier E.P. Catecholaminergic modulation of corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion. *Endocrine Rev* 1989; 10:437-458.
288. Gray G.D., Smith E.R., Damassa D.A., Ehrenkranz J.R.L. and Davidson J.M. Neuroendocrine mechanisms mediating the suppression of circulating testosterone levels associated with chronic stress in male rats. *Neuroendocrinology* 1978; 25:247-256.
289. Lerman S.A., Miller G.K., Bohlman K., Albaladejo V., Leonard J.F., Devas V. and Clark R.L. Effects of corticosterone on reproduction in male Sprague-dawley rats. *Reproductive Toxicology*, Vol. 11, No. 6, pp. 799-805, 1997.

290. Harvey P.W., Er J., Femandes C., Rush K.C., Major I.R. and Cockburn A. Corticosterone does not cause testicular toxicopathology in the rat: relevance to methylxanthines, ACTH and stress. *Hum Exp Toxicol.* 1992;11:505-9.
291. Kamel F. and Kubajak C.L. Modulation of gonadotropin secretion by corticosterone: interaction with gonad01 steoids and mechanism of action. *Endocrinology.* 1987;121:561-8.
292. Tepperman J. *Metabolic and endocrine physiology.* 3rd ed. Chicago IL: Year Book Medical Publishers; 1975:67-8.
293. Mancini R.E., Lavieri J.C., Muller F., Andrada J.A. and Saraceni D.J. Effect of prednisolone upon normal and pathologic human spermatogenesis. *Fertil Steril.* 1966;17:500-13.
294. Gordon Baker H.W. Reproductive effects of nontesticular illness. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, volume 27 - number 4 - december 1998.
295. Luton J.P., Thieblot P., Valcke J.C. et al. Reversible gonadotropin deficiency in male Cushing's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 45:488, 1977.

296. Samuels M.H., Luther M., Henry P. et al. Effects of hydrocortisone on pulsatile pituitary glycoprotein secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 78:211,1994.
297. Pearce G., Tabensky A., Delmas P.D. et al. Corticosteroid induced bone loss in men. *J Clin Endocrinol Metab* 83:810, 1998.
298. Wingfield J.C. and Sapolsky R.M. Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology*, 2003, Vol. 15, 711-724.
299. Welsh T.H., Brinsko S.P., Curley K.O., Forrest D.W., Ing N.H., Love C.C., Lyons J.G., Vogelsang M.M. and Varner D.D. Effect of dexamethasone on serum and testicular concentrations of testosterone in stallions.
300. Danek J. Effect of dexamethasone and flunixin on blood serum testosterone, 17-beta-estradiol concentrations and morphology of spermatozoa in stallions. *Medycyna Weterynaryjna (Vet. Med. Sci. Pract.)* 2004; 60, 1329–1332.
301. Seamans M.C., Roser J.F., Linford R.L., Liu I.K. and Hughes J.P. Gonadotrophin and steroid concentrations in jugular and testicular

- venous plasma in stallions before and after GnRH injection. *J Reprod fertile Suppl* 1991;44:57-67.
302. Schott H.C. Pituitary pars intermedia dysfunction: Equine Cushing's disease. *Vet Clin N Am Equine Pract* 18:237-270, 2002.
303. Boujon C.E., Bestetti G.E., Meier H.P., Straub R., Junker U. and Rossi G.L. Equine pituitary adenoma: A functional and morphological study. *J Comp Pathol* 1993;109:163–178.
304. Heinrichs M.H., Baumgartner W. and Capen C.C. Immunocytochemical demonstration of pro-opiomelanocortin derived peptides in pituitary adenomas of the pars intermedia in horses. *Vet Pathol* 1990;27:419–425.
305. Hillyer M.H., Taylor F.R.G., Mair T.S., Murphy D., Watson T.D.G. and Love S. Diagnosis of hyperadrenocorticism in the horse. *Equine Vet Educ* 1992;4:131–134.
306. Orth D.N. and Nicholson W.E. Bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin in normal equine pituitary and in pituitary tumors of horses with Cushing's disease. *Endocrinology* 1982;111:559–563.
307. Boehringer Ingelheim. Laminitis campaign finds evidence of PPID in middle-aged horses. *Veterinary Record* 2012, 171:239.



308. Heinrichs M., Baumgärtner W. and Capen C.C.  
Immunocytochemical demonstration of proopiomelanocortin - derived peptides in pituitary adenomas of the pars intermedia in Horses. Vet Pathol 1990 27: 419.
309. Orth D.N., Holscher M.A., Wilson M.G., Nicholson W.E., Plue R.E. and Mount C.D. Equine Cushing's Disease: Plasma Immunoreactive Proopiolipomelanocortin Peptide and Cortisol Levels Basally and in Response to Diagnostic Tests. Endocrinology April 1, 1982 vol. 110 no. 4 1430-1441.
310. Donaldson M.T., Jorgensen A.J. and Beech J. Evaluation of suspected pituitary pars intermedia dysfunction in horses with laminitis. J Am Vet Med Assoc. 2004 Apr 1;224(7):1123-7.

## CAPITOLO II

### TECNICHE DIAGNOSTICHE

#### 2.1 VALUTAZIONE MATERIALE SEMINALE

Il classico esame del materiale seminale include la valutazione dell'aspetto del seme all'atto del prelievo, la determinazione del volume, la concentrazione, la motilità, la morfologia ed il pH<sup>(1)</sup>. Ulteriori test includono la valutazione della longevità della motilità spermatica, la batteriologia e la citologia, il test di rigonfiamento ipo-osmotico per valutare l'integrità della membrana spermatica e la colorazione per la differenziazione degli spermatozoi vivi e morti mediante eosina<sup>(1)</sup>. Test più complessi sono rappresentati dalle tecniche di fluorescenza (per valutare lo stato dell'acrosoma, la capacitazione e l'integrità del DNA). Ovviamente il test ottimale per valutare la fertilità è dato dalla percentuale di gravidanza su un numero sufficiente di cavalle. Tuttavia ciò non è quasi mai verificabile per via del ridotto numero di fattrici che spesso uno stallone copre o perché ha una valenza retrospettiva che richiede un lasso di tempo troppo ampio. Nonostante l'esistenza di numerosi test non vi è ad oggi chiarezza circa l'approccio diagnostico in quanto soggetti con stati di ipofertilità più o meno marcata spesso presentano una qualità del seme all'apparenza soddisfacente. Più in generale un materiale seminale scadente indica uno stato di ipofertilità molto probabile mentre un seme di buona qualità non è garanzia di fertilità<sup>(1)</sup>.

### **2.1.1 ASPETTO MACROSCOPICO**

Una valutazione generale del colore e dell'aspetto del seme tal quale apporta utili informazioni e non dovrebbe essere sottovalutata. Il seme può presentare un colore variabile dal grigio al bianco e fornisce una indicazione iniziale circa la concentrazione spermatica. Un materiale seminale particolarmente cremoso è in genere espressione di una elevata concentrazione spermatica. Una colorazione giallastra accompagnata da un odore di urina è espressione di urospermia mentre eiaculati rosa o rossastri indicano emospermia. La presenza di flocculazioni è invece sintomatica di infezione delle vescichette seminali. Un campione acquoso in uno stallone che normalmente presenta una buona qualità del seme è indicativo di una eiaculazione parziale<sup>(1)</sup>.

### **2.1.2 VOLUME**

Per effettuare il calcolo del numero totale degli spermatozoi nell'eiaculato è necessario misurare il volume totale del seme e determinare la concentrazione spermatica. Il volume seminale è in genere diviso in due frazioni, la componente gel e la componente gel-free. Mediante un filtro è possibile separare le due componenti e il volume della frazione gel-free viene misurato<sup>(1)</sup>.

### **2.1.3 CONCENTRAZIONE**

La determinazione della concentrazione degli spermatozoi nella componente gel-free dell'eiaculato è un passaggio fondamentale nella corretta valutazione

della qualità del seme. La concentrazione spermatica viene moltiplicata per il volume del seme gel-free così da ottenere il numero totale degli spermatozoi per eiaculato. Per la conta spermatica vengono utilizzati macchinari basati sullo spettrofotometro e il tradizionale emocitometro<sup>(1)</sup>.

#### **2.1.4 MOTILITA'**

La motilità spermatica dovrebbe essere stabilita il prima possibile dopo la raccolta del seme<sup>(2)</sup>. Il materiale che in questa fase viene a contatto con il seme dovrebbe essere mantenuto a 37°C per evitare shock termico<sup>(3)</sup>. Per una corretta valutazione e per standardizzare la valutazione della motilità del materiale seminale il seme dovrebbe essere diluito con un idoneo extender sino ad una concentrazione compresa tra 25 e 50 x 10<sup>6</sup>/ml<sup>(4,5)</sup>. La motilità spermatica può essere valutata in modo soggettivo ponendo una piccola goccia di seme gel-free (5-10µl) su un vetrino preriscaldato a 37°C e ricoperto mediante vetrino copri-oggetto. In maniera grossolana e con una certa esperienza è possibile stimare la percentuale degli spermatozoi motili e dei progressivi mentre, con una scala da 0 a 4 può essere classificata la velocità degli stessi dove con 0 si intendono spermatozoi immobili e con 4 spermatozoi ad elevata velocità. Si valutano gli spermatozoi al centro del vetrino per evitare di sottostimare la motilità stessa. Una valutazione più oggettiva può essere raggiunta mediante l'uso dell'analisi computerizzata<sup>(5)</sup>. Computer-assisted sperm analysis (CASA) analizza in contemporanea le tracce di un gran numero di spermatozoi determinando diversi

parametri tra cui la motilità, la percentuale degli spermatozoi progressivi, l'ampiezza del movimento laterale della testa, la velocità media e la velocità curvi-lineare. Si possono classificare tre categorie di fattori che influiscono sulla motilità spermatica.

#### Fattori fisiologici.

Il classico eiaculato di un soggetto prepubere mostra motilità e concentrazione spermatiche diminuite e un maggior numero di difetti morfologici rispetto a soggetti più anziani<sup>(6)</sup>. Gli stalloni a riposo sessuale presentano un numero più elevato di spermatozoi nel primo eiaculato accompagnato da una inferiore motilità rispetto ai successivi prelievi. Tale riscontro è determinato dall'accumulo degli spermatozoi nella coda dell'epididimo e nel dotto deferente. Uno studio di Pickett e colleghi<sup>(7)</sup> riferisce che non vi è una variazione della qualità del materiale seminale nel corso dell'anno.

#### Fattori patologici.

Vari fattori in grado di determinare un aumento della temperatura scrotale causano una alterazione della spermatogenesi con conseguente degenerazione testicolare. Ricercatori hanno utilizzato l'irradiazione scrotale per determinare un aumento quantificabile della temperatura scrotale e mimare diversi stati patologici. Friedman e colleghi<sup>(8)</sup> hanno esaminato diversi parametri seminali a 24 e 48 ore. Gli stalloni esposti ad una fonte di calore diretta per 48 ore mostravano un significativo declino sia della motilità totale sia di quella

progressiva a partire dal primo giorno successivo all'esposizione al calore. Il declino continuava sino a raggiungere i livelli più bassi tra i 15 e i 30 giorni successivi. I livelli pre-trattamento venivano nuovamente raggiunti a circa 50 giorni. Gli stalloni sottoposti a trattamento termico per 24 ore mostravano un analogo calo dei principali parametri seminali ma per un periodo di tempo molto più ridotto. Blanchard e colleghi<sup>(9)</sup> hanno esposto due stalloni ad una fonte di calore per 36 ore osservando un calo della motilità progressiva a partire da 1-2 settimane dopo il trattamento. La motilità progressiva raggiungeva il valore minimo a 3-3.5 settimane post-trattamento riportandosi sui livelli pre-trattamento a partire dalla 7° settimana. La degenerazione testicolare può essere anche espressione di senescenza. Una degenerazione legata all'età o di natura idiopatica determina percentuali di motilità spermatica più basse e, più in generale, un calo della qualità seminale<sup>(10)</sup>.

Fattori gestionali.

La gestione degli stalloni e del materiale seminale può interferire con i corretti livelli dei parametri spermatici. Nutraceutici nella dieta sono in grado di migliorare la qualità del seme congelato soprattutto in soggetti con una scadente qualità del materiale seminale<sup>(11)</sup>. Uno studio di Samper e colleghi<sup>(12)</sup> ha invece valutato l'effetto di quattro diversi lubrificanti. Sebbene l'effetto di diversi lubrificanti al tempo 0 non alterava la motilità progressiva tuttavia si riscontravano differenze significative a partire dalle 24 ore. Anche gli extender

seminali utilizzati con concentrazioni scorrette e gestiti in maniera errata possono influire negativamente sulla motilità. Sieme e colleghi<sup>(13)</sup> hanno invece evidenziato che la motilità progressiva alle 24 ore era correlata negativamente con il numero dei tentativi di monta e il tempo trascorso prima dell'eiaculazione. La motilità spermatica è anche influenzata dalla scelta dell'antibiotico come evidenziato da Varner e colleghi<sup>(14)</sup> e da Aurich e Spargser<sup>(15)</sup>. Inoltre trattamenti ormonali possono determinare una significativa diminuzione della motilità<sup>(16)</sup> così come l'immunizzazione verso il GnRH<sup>(17)</sup>.

### **2.1.5 MORFOLOGIA**

Dopo la rimozione del gel è possibile effettuare la valutazione della morfologia degli spermatozoi utilizzando un microscopio ad ingrandimento 1000x o superiore. La morfologia spermatica può essere valutata esaminando preparati di campioni fissati ma non colorati (rapporto 1:4) in soluzione salina tamponata con microscopio a contrasto di fase<sup>(18)</sup>. Questo metodo permette una eccellente visualizzazione dei difetti spermatici ma la necessità dell'utilizzo di ingrandimenti 1000x a contrasto di fase ne limitano l'utilizzo ai grossi laboratori. Quando si utilizza questo metodo è importante alcune volte dopo la preparazione del vetrino apporre un copri-oggetto per facilitare l'esame. La morfologia spermatica può anche essere valutata esaminando strisci colorati con microscopio ottico e per tale scopo sono stati utilizzati diversi metodi di colorazione<sup>(19)</sup>. Non si ha un riscontro oggettivo circa l'effetto dei coloranti sulla

morfologia spermatica<sup>(20)</sup>. Di comune utilizzo per la valutazione della morfologia spermatica è l'eosina-nigrosina. L'eosina non penetra le cellule con membrana intatta riuscendo a differenziare gli spermatozoi vivi, ovvero con membrana integra, da quelli morti che invece si colorano di rosso per la presenza di membrane danneggiate. La nigrosina provvede invece uno sfondo viola che consente la visualizzazione degli spermatozoi non colorati. Al di là del metodo utilizzato per preparare il campione almeno 100 spermatozoi dovrebbero essere esaminati e classificati. In presenza di più difetti su uno spermatozoo è consigliato segnalarli tutti<sup>(21,22)</sup> ed in tal caso la somma della percentuale dei difetti e quella degli spermatozoi normali non sarà pari al 100%. Altri autori consigliano di classificare separatamente gli spermatozoi con singoli difetti e quelli con difetti multipli in quanto questi ultimi rappresentano alterazioni della spermatogenesi di maggiore portata<sup>(22)</sup>. Non si è a disposizione di un sistema di classificazione che permetta di correlare chiaramente i difetti spermatici con la fertilità e ciò accentua l'importanza di una corretta valutazione delle singole anomalie affiancata dall'intero esame clinico del soggetto<sup>(23)</sup>. La presenza di altre cellule dovrebbe essere anch'essa indicata<sup>(21)</sup>. Anomalie a carico dello spermatozoo includono i difetti acrosomiali per via di acrosomi protrudenti, irregolari o staccati, difetti della testa rappresentati da macro e microcefalia, teste piriformi ed appiattite e teste multiple. A carico del pezzo intermedio possono essere riscontrati aplasia segmentale del manicotto mitocondriale, il ripiegamento od arrotolamento della coda a questo livello, la pseudogoccia e la



presenza di una doppia coda o di un abbozzo di coda. La percentuale di teste staccate normali e anomale vengono classificate separatamente mentre i teratoidi idealmente devono essere classificati come una categoria completamente separata. La patogenesi e gli effetti sulla fertilità di specifici difetti spermatici sono stati studiati maggiormente nei tori. C'è un'ampia variabilità nella morfologia degli spermatozoi tra gli stalloni in attività<sup>(24-27)</sup> ma, in generale, lo stallone medio presenta circa il 50% di spermatozoi morfologicamente normali<sup>(21)</sup>. La morfologia spermatica può variare considerevolmente durante la stagione riproduttiva e dovrebbero essere effettuate valutazioni routinarie (ogni 2-4 settimane) per determinare le caratteristiche della morfologia spermatica di un particolare stallone<sup>(26)</sup>. A carico dell'acrosoma si riscontra più di frequente il rigonfiamento dello stesso e può essere causato da fattori ambientali quali aumentata temperatura testicolare, stress e tossine ma può anche avere un'origine genetica. Nei tori è stata evidenziata la correlazione tra acrosomi protrudenti ed un gene recessivo autosomico legato al sesso mentre nei verri il difetto è stato associato a geni dominante e recessivo sempre legati al sesso<sup>(28)</sup>. Generalmente i soggetti interessati producono percentuali veramente notevoli di spermatozoi patologici senza la contemporanea presenza di significativi cambiamenti nella percentuale degli altri difetti<sup>(28,29)</sup>. Tali riscontri non sono stati evidenziati negli stalloni dove l'incidenza delle anomalie a carico dell'acrosoma sono piuttosto rare<sup>(26)</sup>. Tuttavia singoli stalloni potrebbero evidenziare un'incidenza notevole delle anomalie a carico dell'acrosoma facendo supporre

anche in questa specie una sottostante causa genetica come ipotizzato da Hurtgen e Johnson<sup>(30)</sup>. Studi recenti che si sono basati sull'impiego del microscopio elettronico hanno evidenziato che la reale incidenza dei difetti acrosomiali potrebbe essere molto più elevata rispetto a quanto osservato col microscopio ottico. Mediante microscopio elettronico è stato possibile riscontrare una vasta gamma di alterazioni a carico dell'acrosoma tra cui acrosomi prematuramente reattivi, acrosomi ondulanti, acrosomi separati dal nucleo, invaginamento della membrana acrosomiale nel nucleo, aplasia o rarefazione e dissoluzione dell'acrosoma, vescicolazioni e inclusioni amorfe<sup>(31-33)</sup>. Nello studio di Hurtgen e Johnson<sup>(30)</sup> è stato osservato che una elevata incidenza delle anomalie acrosomiali aveva implicazioni negative sulle percentuali di gravidanza per ciclo tuttavia con l'eccezione di uno stallone che a fronte di alterazioni marcate a carico dell'acrosoma sul 50% degli spermatozoi presentava una percentuale di gravidanza su 8 fattrici del 100%. Uno studio di Varner e collaboratori<sup>(54)</sup> confermava l'esistenza di una alterazione della reazione acrosomiale valutata mediante elettroni-microscopia su 5 stalloni affetti da infertilità idiopatica. Diversi studi riportano che l'incidenza di difetti della testa degli spermatozoi è relativamente elevata rappresentando il primo o il secondo difetto più frequente nell'eiaculato<sup>(24-27)</sup>. La forma della testa è determinata principalmente dalla forma del nucleo che, a sua volta, dipende da forze estrinseche esercitate dalle cellule del Sertoli, dal manicotto caudale dello spermatide o da fattori intrinseci che influiscono sulla condensazione della

cromatina nucleare<sup>(29)</sup>. Alcuni di questi fattori potrebbero essere implicati nella produzione di teste piriformi e appiattite. Nei tori questi difetti sembra si sviluppino durante la spermatogenesi<sup>(34,35)</sup>. Spermatozoi microcefali e macrocefali sono probabilmente la conseguenza di danni a spermatociti primari e secondari che quindi presentano una irregolare distribuzione del contenuto di cromatina nucleare dopo una divisione cellulare anomala<sup>(29,35)</sup>. I vacuoli nucleari negli stalloni potrebbero essere presenti con o senza invaginazioni della membrana nucleare nel nucleo<sup>(31,33)</sup>. I vacuoli nucleari appaiono come punti scuri negli strisci colorati con eosina-nigrosina e possono essere osservati ovunque nella testa degli spermatozoi pur essendo di difficile interpretazione diagnostica. Studi in vitro hanno evidenziato che spermatozoi con difetti della testa presentano difficoltà nel legame con la zona pellucida mentre rimane inalterata la capacità di penetrare la zona e fecondare gli oociti<sup>(36-38)</sup>. Negli stalloni Jasko e collaboratori<sup>(27)</sup> hanno osservato una correlazione negativa tra la percentuale dei difetti della testa e la fertilità riportando che, tra le diverse categorie morfologiche spermatiche, la percentuale di difetti della testa mostrava la più elevata variabilità di percentuali di gravidanza per ciclo. Love e colleghi<sup>(26)</sup> hanno anche osservato un'associazione tra alterazioni della testa dello spermatozoo e fertilità e hanno stimato che un incremento dell'1% nella percentuale dei difetti della testa risultava in una riduzione dello 0,67% nelle percentuali di gravidanza per ciclo. Held e collaboratori<sup>(39)</sup> riportavano il caso di uno stallone arabo di 9 anni utilizzato per coprire un numero indeterminato di

cavalle in un periodo di tre anni senza determinare gravidanze e con il 92% di anomalie spermatiche di cui 75% difetti della testa, il 57% dei quali con vacuoli nucleari singoli o multipli. Un comune difetto del pezzo intermedio è il ripiegamento distale del pezzo intermedio che appare al microscopio ottico come una piega nella regione distale del pezzo intermedio. Nella piega è quasi sempre presente una goccia citoplasmatica distale. Nei tori si sviluppa mentre gli spermatozoi migrano verso la metà distale della coda dell'epididimo probabilmente in associazione con concentrazioni di ioni alterate in seguito a insulti ambientali<sup>(29,34,35)</sup>. Pieghie doppie del pezzo intermedio solitamente accompagnano l'avvolgimento del pezzo principale con ritenzione di materiale citoplasmatico. Hellander e collaboratori<sup>(40)</sup> hanno riportato il caso di uno stallone mezzosangue di 8 anni di età con scarsa fertilità in presenza di anomalie della coda nell'85% degli spermatozoi che all'esame ultrastrutturale evidenziavano gravi alterazioni a carico delle membrane mitocondriali e dell'assonema. A carico del pezzo principale possono manifestarsi il ripiegamento e l'avvolgimento della coda di solito con ritenzione di citoplasma e meno frequentemente aplasia o sviluppo anomalo. L'aplasia segmentale dello strato mitocondriale potrebbe essere osservata in una bassa percentuale di spermatozoi sebbene alcuni spermatozoi manchino di una piccola parte di manicotto mentre altri ne sono totalmente privi. L'aplasia segmentale del manicotto mitocondriale predispone alla rottura quando lo spermatozoo acquisisce motilità. La lesione sembra verificarsi più frequentemente nella

regione dell'annulus ma può verificarsi in una regione più prossimale o nel mezzo del pezzo intermedio. Vengono occasionalmente osservati discontinuità del pezzo intermedio e protrusione delle fibre dell'assonema. Negli stalloni viene osservato la presenza di masse microtubulari disorganizzate nelle regioni del collo, del pezzo intermedio e, occasionalmente, della testa<sup>(41)</sup>. Nello studio, sebbene se ne ipotizzasse una origine genetica, non si riscontrava un chiaro effetto avverso sulla fertilità. Alterazioni dell'organizzazione microtubulare sono state riscontrate anche da Alvarenga<sup>(42)</sup> che ha posto l'accento sulla necessità dell'utilizzo del microscopio elettronico per l'evidenziazione di tali difetti. La duplicazione della coda è un difetto non comune che è associato con la duplicazione della fossa di impianto e la replicazione del centriolo distale. Gli spermatozoi con teste e code multiple potrebbero avere una struttura della testa normale con un contenuto in DNA normale ma anomalie della forma del nucleo e una alterata condensazione del DNA in una o più teste. Le teste sono di solito completamente separate e nella coda complessi filamentosi assiali indipendenti sono tenuti assieme da un manicotto fibroso o mitocondriale comune<sup>(23)</sup>. Questi spermatozoi hanno origine da spermatidi multinucleati e/o come risultato di una incompleta dissociazione cellulare durante la divisione spermatogonica<sup>(43)</sup>. L'incidenza di difetti specifici del pezzo intermedio e della coda e i loro effetti sulla fertilità nei cavalli sono difficili da accertare perché vengono di rado riportati separatamente. Alcuni autori hanno osservato una correlazione negativa tra difetti del pezzo intermedio/coda e percentuali di gravidanza per ciclo<sup>(27,33)</sup>.

mentre Love e colleghi<sup>(26)</sup> non hanno osservato una correlazione delle pieghe del pezzo intermedio con la fertilità pur riscontrando una tendenza in tal senso. Le gocce citoplasmatiche rappresentano normali residui del citoplasma degli spermatidi. Esso permane attaccato nella regione del collo dello spermatozoo dopo il rilascio nei tubuli seminiferi per cui quasi tutti gli spermatozoi possiedono gocce citoplasmatiche in questa sede nella fase di passaggio alla testa dell'epididimo. Durante il processo di maturazione lungo il transito attraverso il corpo dell'epididimo, la goccia si muove dalla sua posizione prossimale del collo alla porzione distale del pezzo intermedio adiacente all'annulus<sup>(23)</sup>. Nei tori circa il 35% degli spermatozoi perdono la goccia distale nella coda dell'epididimo ma la maggior parte degli spermatozoi perdono la goccia distale solo dopo essere venuti a contatto con le secrezioni delle ghiandole sessuali accessorie<sup>(29)</sup>. Quindi le gocce citoplasmatiche prossimali e distali negli spermatozoi eiaculati rappresentano anomalie. Le gocce citoplasmatiche sono spesso l'anomalia più frequente nell'eiaculato soprattutto in stalloni giovani in età peri-pubertale<sup>(21,24-27)</sup>. Ricerche nei tori tendono ad escludere che la presenza delle gocce citoplasmatiche negli spermatozoi eiaculati sia da attribuire alla fase di transito nell'epididimo mentre potrebbe risultare da traumi a spermatidi e spermatociti<sup>(34,35)</sup>. Gocce citoplasmatiche prossimali hanno gravi effetti sulla fertilità nei tori e livelli anche solo del 10% potrebbero essere associati ad una diminuzione della fertilità<sup>(48)</sup>. Jasko e collaboratori<sup>(27)</sup> hanno dato conferma di quanto già riscontrato nei tori

osservando l'esistenza di una marcata correlazione negativa tra la percentuale di gocce citoplasmatiche prossimali e le percentuali di gravidanza per ciclo rispetto alla correlazione con le gocce distali. Persch e collaboratori<sup>(33)</sup> indicavano una correlazione negativa tra la percentuale di gocce citoplasmatiche e la percentuale di gravidanza per ciclo ma non differenziavano nel loro lavoro le gocce prossimali dalle gocce distali. In un altro studio comunque la percentuale di gocce citoplasmatiche prossimali non era associata con la fertilità negli stalloni<sup>(26)</sup>. Più del 30% dei difetti della testa degli spermatozoi, >25% delle gocce citoplasmatiche prossimali o <40% di spermatozoi normali sono sufficienti per destare preoccupazione<sup>(21,44)</sup>. Inoltre si ritiene che la presenza di cellule germinali rotonde nell'eiaculato debba essere sempre motivo di sconcerto<sup>(23)</sup>. Teste staccate sono comunemente osservate in basse percentuali (5%) nell'eiaculato<sup>(24-27)</sup> ma potrebbero essere presenti in numero elevato nei casi di accumulo nei tratti efferenti<sup>(21)</sup>. Teste staccate potrebbero derivare da una anomala spermiogenesi o dall'invecchiamento degli spermatozoi nel tratto efferente. Ovviamente teste staccate anomale indicano un'alterazione più grave della spermatogenesi rispetto alle normali teste staccate. Love e collaboratori<sup>(26)</sup> hanno stimato che un incremento dell'1% nella percentuale di teste staccate risulta in una riduzione del 2,6% nelle percentuali di gravidanza per ciclo negli stalloni. Il termine teratoide è stato utilizzato per descrivere spermatozoi che sono così gravemente deformati che la cellula è a malapena identificabile come spermatozoo. Nella maggior parte dei casi la testa presenta forma anomala e la

coda è arrotolata strettamente attorno alla testa; queste cellule inglobano irrimediabilmente eosina indicando una soluzione di continuità del plasmalemma. Altre cellule che potrebbero essere trovate nell'eiaculato includono emazie, cellule germinali rotonde e cellule del Sertoli necessitando di altre tecniche di colorazione. La valutazione della morfologia spermatica non rappresenta una semplice procedura tecnica ma è strettamente finalizzata alla valutazione della potenziale fertilità degli stalloni e necessita di una chiara conoscenza dei meccanismi fisiologici e patologici che interessano l'apparato riproduttore. A seconda del grado di degenerazione testicolare possono verificarsi anomalie spermatiche più o meno evidenti. Cause comuni di lieve degenerazione testicolare possono essere rappresentate da una elevata temperatura testicolare e un'alterazione di natura ormonale. Sebbene non siano state condotte ricerche analoghe negli stalloni un esperimento nei tori ha dimostrato che una temperatura testicolare elevata e un'alterazione endocrina producono effetti simili sulla morfologia spermatica<sup>(34)</sup>. Le cellule germinali testicolari possiedono una diversa sensibilità agli agenti patogeni con spermatidi e spermatociti particolarmente sensibili mentre spermatogoni e spermatozoi presenti nell'epididimo maggiormente resistenti. Se l'esposizione al trauma è prolungata, ci si aspetta una più ampia gamma di difetti nello stesso eiaculato. Se l'alterazione è reversibile la qualità del materiale seminale migliora nel momento in cui gli spermatogoni che hanno resistito al trauma riprendono a produrre spermatozoi normali. Una elevata temperatura testicolare determina un



aumento della frequenza metabolica e della domanda di ossigeno ma le caratteristiche dell'arteria testicolare, lunga e notevolmente contorta, limitano l'apporto ematico ai testicoli. Di conseguenza l'insufficiente apporto ematico determina un transitorio stato ipossico testicolare con conseguenti effetti deleteri sulla produzione spermatica e sulla sua qualità<sup>(45)</sup>. Diversi studi<sup>(8,46)</sup> hanno evidenziato un aumento delle anomalie spermatiche dopo un'esposizione dei testicoli a fonti di calore per 24-48 ore con un picco compreso tra i 25 e i 35 giorni successivi e una restitutio che veniva raggiunta solo 50-75 giorni dopo il trauma. Tra le cause di aumento della temperatura testicolare si annoverano l'aumentata temperatura corporea in corso di stati febbrili, elevata temperatura ambientale ed esercizio fisico intenso, una aumentata temperatura locale a causa di trauma scrotale o dermatite, orchite, periorchite ed epididimite, diminuita irradiazione locale per via di stati patologici quali idrocele, edema scrotale e accumulo di grasso attorno al cordone spermatico e alterazione della motilità testicolare normale in relazione ad adesioni della tunica o ernie inguinali o scrotali. I sospensori scrotali, di ampio utilizzo su stalloni da salto ostacoli e trotto, sono in grado di aumentare la temperatura della superficie scrotale di 1-2°C oltre la normale temperatura durante l'esercizio<sup>(47)</sup>. Quindi i sospensori scrotali andrebbero rimossi immediatamente una volta finito l'esercizio o il loro utilizzo dovrebbe essere scoraggiato<sup>(23)</sup>. Una alterazione della concentrazione di testosterone intra-testicolare esita nella produzione di spermatozoi anomali. I principali fattori in grado di alterare l'asse ormonale sono il cortisolo, gli

steroidi anabolizzanti e i progestageni: questi ormoni inibiscono l'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH), l'ormone luteinizzante (LH) ed infine la produzione di testosterone. Gli effetti deleteri del cortisolo sulla spermatogenesi sono stati dimostrati direttamente nei tori mediante trattamento con corticosteroidi<sup>(34)</sup>. Malattie, esercizio estenuante, cambiamenti nella scala di dominanza sociale e trasporto su lunghe distanze sono alcuni degli eventi che potrebbero risultare in stati di stress con aumentata produzione di cortisolo e spermatozoi anomali. Chiaramente lo stress deve persistere per un periodo di tempo abbastanza lungo così da abbassare la concentrazione di testosterone a livelli tali da influire sulla qualità del seme. In uno studio di Janett e colleghi<sup>(48)</sup> su stalloni veniva evidenziato che un esercizio fisico ripetuto in maniera estenuante per un periodo di 4 settimane era in grado di determinare negli stalloni aumentate concentrazioni di cortisolo in circolo: 3 settimane dopo l'inizio del periodo di esercizio si riscontrava un'aumentata produzione di spermatozoi anomali. Nello studio si verificava un aumento del testosterone subito dopo esercizio, fenomeno attribuito alla produzione surrenale indotta dallo stress. Le elevate concentrazioni di cortisolo probabilmente avevano un effetto più prolungato sulla produzione testicolare di testosterone aspetto che non veniva riscontrato immediatamente dopo l'esercizio. La percentuale di spermatozoi normali era simile a quella osservata prima del periodo di esercizio solo 3-4 settimane dopo la fine dell'esercizio stesso. Il testosterone ed altri steroidi anabolizzanti sono stati consigliati come terapia per cavalli debilitati ma

vengono anche utilizzati in cavalli sani per incrementare le masse muscolari e le performance sportive<sup>(23)</sup>. Non solo gli steroidi anabolizzanti costituiscono doping in diversi sport ma influiscono negativamente sulla produzione spermatica degli stalloni<sup>(23)</sup>. Il trattamento degli stalloni con testosterone o steroidi anabolizzanti determina una riduzione della secrezione di LH, deplezione ed atrofia delle cellule del Leydig, diminuzione degli enzimi steroidogenici testicolari e una riduzione della secrezione di testosterone, delle dimensioni scrotali, della produzione spermatica e della percentuale di spermatozoi normali<sup>(49-52)</sup>. Oltre agli stati patologici la morfologia spermatica potrebbe essere influenzata anche dal periodo dell'anno sebbene vi sia controversia circa i risultati di diversi studi. Un lavoro di van der Holst<sup>(53)</sup> ha evidenziato che le anomalie spermatiche diminuivano durante la stagione riproduttiva mentre Blottner e collaboratori<sup>(54)</sup> hanno descritto che la percentuale di spermatozoi anomali aumentava durante la stagione riproduttiva e Bielanski e colleghi<sup>(55)</sup> non hanno invece riscontrato differenze nella morfologia spermatica tra le due fasi dell'anno. In altri studi è stato ipotizzato che la stagione potrebbe avere effetti diversi sulla morfologia spermatica a seconda della razza dello stallone. Uno studio riportava che la percentuale di spermatozoi normali era inferiore durante l'estate rispetto alla primavera e alla stagione non riproduttiva (autunno ed inverno) negli stalloni da salto ostacoli del Nord Europa<sup>(56)</sup> mentre la percentuale degli spermatozoi normali era maggiore durante l'autunno e la primavera se confrontate con l'inverno e l'estate in stalloni Franches-

Montagnes<sup>(57)</sup>. Le differenze nella morfologia spermatica tra stagioni potrebbe essere il risultato delle differenze tra fotoperiodo, stress da freddo e/o qualità del cibo<sup>(23)</sup>. Al di là della causa gli effetti della stagione sulla morfologia spermatica coinvolgono probabilmente anche cambiamenti endocrini connessi a un'alterazione centrale della secrezione di gonadotropine e testosterone<sup>(23)</sup>. La qualità del seme sembra incrementare dopo la pubertà raggiungendo i livelli ottimali tra i 3 e i 9 anni<sup>(24)</sup> per poi diminuire con l'avanzare dell'età negli stalloni<sup>(23)</sup>. Gli effetti dell'età sono probabilmente correlati a fattori quali una poco efficiente spermatogenesi nei puledri e una degenerazione testicolare dovuta all'età negli stalloni anziani<sup>(24,58)</sup>. Forme idiopatiche di degenerazione testicolare possono interessare soggetti giovani seppure vengano più spesso riscontrate in stalloni di età media o anziani<sup>(23)</sup>. Sembrano essere correlate alla anomala steroidogenesi testicolare per via di un'alterata funzionalità delle cellule del Sertoli e della secrezione di inibina piuttosto che ad anomalie dell'asse ipotalamo-ipofisario. La degenerazione testicolare idiopatica ha la tendenza ad alterare la consistenza e le dimensioni testicolari oltre a mostrare un andamento progressivo e risultare in un declino nella produzione spermatica e nella qualità del seme<sup>(59)</sup>. Sono stati effettuati studi sugli effetti della razza sulla morfologia degli spermatozoi. In Olanda, stalloni Sella, Welsh e New Forest sottoposti a controllo a 3 anni di età per la registrazione in razza presentavano una maggiore percentuale di spermatozoi normali (circa il 70%) rispetto a stalloni Frisoni e Shetland (circa il 55%)<sup>(19)</sup>. Anche altri autori hanno

riportato un effetto della razza sulla morfologia spermatica ma le differenze nell'anamnesi e nel management, le grosse differenze nel numero di stalloni rappresentativi delle varie razze, la grande variabilità tra soggetti della stessa razza e la mancanza di valutazione dell'interazione con il parametro età rende molto difficile accertare se l'effetto sulla morfologia spermatica possa essere attribuito in questi studi solo alla razza<sup>(24,60)</sup>. La considerazione più corretta è che la variabilità individuale sembra molto maggiore rispetto alla razza<sup>(23)</sup>. Comunque uno studio recente in stalloni shetland pony ha dimostrato che coefficienti di in-breeding superiori al 2% si associavano ad una percentuale più elevata di anomalie spermatiche. La percentuale di spermatozoi vivi morfologicamente normali diminuiva dal 47,6% negli stalloni con coefficiente di in-breeding 1% sino al 32,6% negli stalloni con coefficiente superiore al 12%<sup>(61)</sup>.

### **2.1.6 pH**

Il pH del seme gel-free può essere misurato utilizzando un pHmetro correttamente calibrato. Il pH normale del seme dello stallone varia tra 7.2 e 7.7. Stagione dell'anno, frequenza di eiaculazione e concentrazione spermatica sono fattori che possono influenzare il pH del seme. Esiste una correlazione negativa tra volume seminale e pH e tra numero degli spermatozoi nell'eiaculato e pH<sup>(62,63)</sup>. Un pH estremamente elevato può essere associato ad urospermia o infezione del tratto genitale interno.

## 2.2 ESAME ECOGRAFICO

Prima dell'esame ecografico i testicoli, l'epididimo, il cordone spermatico e la regione inguinale dovrebbero essere visualizzati e palpato permettendo al veterinario di riscontrare eventuali anomalie e allo stallone di rilassarsi. Per garantire un buon contatto tra la sonda e la superficie scrotale viene apposta una notevole quantità di gel o, in alternativa, metanolo, etanolo o olio minerale<sup>(64)</sup>. Per l'esame del contenuto scrotale viene in genere utilizzata una sonda lineare o microconvex da 7.5MHz mentre una sonda a frequenza 10MHz potrebbe essere utile per visualizzare strutture più superficiali<sup>(64)</sup>. All'inizio dell'esame ecografico la mano sinistra spinge il testicolo destro verso l'addome ed al tempo stesso mantiene il sinistro in posizione<sup>(64)</sup>. Il trasduttore viene posizionato lateralmente al testicolo perpendicolarmente al suo asse longitudinale. La sonda viene quindi mossa lentamente così da valutare diverse sezioni trasversali<sup>(64)</sup>. L'immagine sagittale del parenchima testicolare viene invece ottenuta posizionando la sonda sulla superficie craniale del testicolo e orientando caudalmente la sonda oppure posizionando la sonda ventralmente al testicolo e parallelamente all'asse longitudinale del testicolo stesso<sup>(64)</sup>. Testa, corpo e coda dell'epididimo possono essere più difficili da identificare ed il trasduttore dovrebbe essere posizionato direttamente su ognuna di queste regioni<sup>(64)</sup>. Nel caso della coda dell'epididimo la sonda dovrebbe essere localizzata appena

davanti alla coda dell'epididimo in prossimità del bordo caudale del testicolo ed il fascio di ultrasuoni indirizzato caudalmente verso la coda stessa<sup>(64)</sup>. Dopo l'esame del testicolo e dell'epididimo la sonda dovrebbe essere posizionata nella regione inguinale per l'esame del cordone spermatico<sup>(64)</sup>. In tal caso la sonda dovrebbe essere posizionata perpendicolarmente alla direzione del cordone stesso così da ottenere sezioni trasverse del cordone<sup>(64)</sup>. Studi sulle caratteristiche anatomiche dell'apparato riproduttore dello stallone hanno riscontrato che nella maggior parte dei casi (87%) i testicoli ricevono l'apporto ematico da una sola arteria testicolare mentre nel 14% dei casi sono presenti due arterie, una attorno al polo caudale del testicolo ed un'altra localizzata nella metà craniale o nel terzo craniale della parte laterale del testicolo<sup>(57,58)</sup>. Solo il 2% dei testicoli sono irrorati da tre arterie testicolari, una lungo il margine epididimale e il polo caudale e due sulla parte laterale del testicolo. In questi studi veniva anche evidenziato un notevole effetto trofico sul parenchima testicolare da parte delle arterie addizionali laterali che determinavano una forma piriforme con evidente prominente laterale in corrispondenza delle arterie stesse. Come atteso i testicoli irrorati da una singola arteria presentavano invece forma ellissoide. Il parenchima testicolare presenta una ecogenicità uniforme<sup>(64)</sup>. In genere si riesce ad identificare una piccola quantità di fluido nella cavità vaginale tra le tuniche parietale e viscerale<sup>(64)</sup>. La vena centrale del testicolo è visibile come una linea anecoica che attraversa il centro del parenchima testicolare<sup>(64)</sup>. La vena centrale aumenta in ampiezza cranio-dorsalmente là dove

va ad inserirsi nel cordone spermatico mentre si assottiglia dorso-ventralmente<sup>(64)</sup>. Tipicamente la larghezza della vena centrale varia tra 1 e 4 mm a seconda della regione visualizzata e l'angolazione della sonda<sup>(64)</sup>. Con una frequenza di 7.5MHz o superiore le branche piccole dell'arteria testicolare possono essere evidenziate in corrispondenza della superficie del testicolo nella tunica albuginea<sup>(64)</sup>. Come evidenziato da Love e colleghi nel 1991<sup>(65)</sup> la misurazione ecografica del parenchima testicolare è estremamente accurata. Per la misurazione della larghezza testicolare la sonda dovrebbe essere mantenuta sulla superficie laterale del testicolo e diretta perpendicolarmente all'asse longitudinale del testicolo nella parte più larga di questo. L'altezza viene misurata ponendo il trasduttore sulla superficie ventrale del testicolo mentre la lunghezza può essere determinata ponendo la sonda nel margine craniale del testicolo e indirizzando la sonda caudalmente ma in diversi stalloni è più semplice effettuare una misurazione manuale della lunghezza. Mediante esame ecografico è possibile ottenere anche la misurazione della larghezza scrotale totale. Uno studio di Kenney e colleghi<sup>(66)</sup> del 1983 evidenziava che un valore di 8 cm era necessario per poter classificare uno stallone come riproduttore potenzialmente soddisfacente. Le misurazioni ottenute possono essere utilizzate per prevedere la produzione spermatica giornaliera effettuando un calcolo che permette di risalire ad un ellissoide. Il volume testicolare totale viene quindi calcolato utilizzando la formula per il volume ellissoide:  $V_t = (4/3\pi)(W/2)(H/2)(L/2)$  dove (W = larghezza; H = altezza; L = lunghezza)<sup>(102,103)</sup>.



Visualizzato in sezione trasversale il cordone spermatico presenta una caratteristica eterogeneità con aree anecoiche circolari circondate da regioni più iperecoiche. Questo aspetto è determinato dalle numerose sezioni trasversali del lume dell'arteria testicolare, dei vasi del plesso pampiniforme e del dotto deferente. L'ecografia Doppler e color Doppler è stata utilizzata per valutare il flusso ematico dei vasi del cordone spermatico negli stalloni<sup>(67,68)</sup> permettendo l'ottenimento di valori di riferimento per gli stalloni normali. Un adeguato apporto ematico al testicolo è fondamentale per la sua funzione. Diversi studi hanno riportato le conseguenze di un'alterata irrorazione testicolare sia nell'uomo<sup>(65-67,69-72)</sup> sia negli stalloni<sup>(73)</sup>. Negli stalloni si verificano con una relativa frequenza la torsione del cordone spermatico e i traumi scrotali e il più delle volte si effettua una castrazione monolaterale per prevenire un danno permanente all'altro testicolo<sup>(74-76)</sup>. Una corretta perfusione testicolare è necessaria per garantire la funzionalità testicolare<sup>(64)</sup>. In altre specie un ridotto apporto ematico è causa di riduzione delle dimensioni testicolari e di una spermatogenesi alterata<sup>(77,78,79)</sup>. Le tecniche di nuova introduzione permettono di valutare in maniera attendibile la vascolarizzazione dei testicoli dello stallone e di misurare in maniera oggettiva il flusso ematico testicolare<sup>(64)</sup>. L'eco-color-doppler (CDU) è lo strumento di elezione ed è stato utilizzato con successo in campo umano per la diagnosi di patologie scrotali quali varicocele, tumori testicolari, epididimiti, orchiti, torsione testicolare e infarto testicolare<sup>(81-87)</sup>. In particolare CDU si è rivelato utile nello stabilire la distribuzione dei vasi

sanguigni e permette la misurazione diretta delle velocità di flusso sanguigno all'interno di specifici vasi nei vari stadi del ciclo cardiaco (velocità sistolica e diastolica)<sup>(88,89)</sup>. Mediante eco-doppler si ottengono dunque le misurazioni corrette della velocità di flusso ematico in sistole e diastole (PSV, picco di velocità sistolica; EDV, velocità diastolica finale) e, a partire da questi parametri, vengono calcolati gli indici relativi alla plasticità e resistenza dei vasi e dei tessuti circostanti. In un esame ecografico eco-doppler vengono regolarmente calcolati sia l'indice di resistività  $RI = [PSV-EDV]/PSV$  sia l'indice di pulsatilità  $PI = [velocità\ massima - velocità\ minima]/velocità\ media$ <sup>(88,89)</sup>. Contrariamente a PSV ed EDV gli indici estrapolati, RI e PI, sono indipendenti da età, peso corporeo, frequenza delle pulsazioni e volume testicolare e, quindi, cambiamenti significativi nei loro valori sono solitamente associati a patologie vascolari<sup>(90)</sup>. Ottenere valori ripetibili delle misurazioni Doppler del flusso arterioso è tecnicamente complesso per cui si preferisce ottenere dei valori medi ottenuti mediante 2-7 valutazioni<sup>(64)</sup>. RI si è visto essere maggiormente utile nel differenziare anomalie del flusso sanguigno<sup>(91)</sup>. Questo parametro presenta valori inferiori quando sono presenti alterazioni di natura infiammatoria mentre valori aumentati nei testicoli di soggetti anziani probabilmente a causa di processi degenerativi in corso<sup>(92,93)</sup>. I testicoli atrofici degli uomini affetti da sindrome di Klinefelter possiedono un flusso ematico altamente resistivo associato a valori significativamente aumentati di RI<sup>(94,95)</sup>. La degenerazione progressiva del parenchima testicolare così come l'arteriosclerosi

spontanea dei vasi testicolari è stata descritta sia negli uomini sia negli animali<sup>(96,97)</sup>. Comunque non è chiaro se un flusso ematico testicolare resistivo sia dovuto primariamente a cambiamenti vascolari o secondario ad atrofia parenchimale accompagnata da fibrosi dei tubuli seminiferi<sup>(95)</sup>. Recentemente sono stati introdotti altri parametri della perfusione testicolare. Il flusso arterioso totale può essere calcolato ( $TABF = TAM \times A$ ;  $A =$  area della sezione trasversale del vaso calcolata secondo  $A = \pi r^2$ ; unità di misura ml/min) una volta stabilito il diametro dell'arteria che supporta il sangue all'organo valutato e la "time averaged mean velocity" (TAM) attraverso lo stesso vaso. Si può calcolare la frequenza del flusso arterioso totale utilizzando il volume totale dell'organo (frequenza di TABF =  $TABF/V \times 100$ ;  $V =$  volume totale; unità di misura = ml/min/100gr). La frequenza di TABF rappresenta il miglior parametro della perfusione dell'organo e nell'uomo è notevolmente influenzata dal varicocele<sup>(98)</sup>. Alterazioni dei valori della frequenza di TABF potrebbero fungere da segnali precoci di patologie testicolari associate ad alterazioni vascolari in grado di influire sulla funzione testicolare e sul suo volume<sup>(64)</sup>. La misurazione dell'arteria testicolare può avvenire in corrispondenza del cordone spermatico oppure nelle porzioni prossimale e distale della parte marginale<sup>(99)</sup>. Le misurazioni più attendibili vengono ottenute dalla porzione marginale dell'arteria testicolare sul polo caudale del testicolo a livello della coda dell'epididimo<sup>(100,101)</sup>. Una caratteristica forma dell'onda del flusso ematico testicolare nello stallone è bifasica con un alto picco sistolico e un basso picco

diastolico<sup>(64)</sup>. Può essere anche monofasica con il solo picco sistolico<sup>(64)</sup>. Lo spettro bifasico è tipico della parte convoluta dell'arteria testicolare nel cordone spermatico mentre lo spettro monofasico è spesso individuato nella parte marginale<sup>(64)</sup>. Uno studio di Pozor e Kolonko<sup>(104)</sup> del 2000 ha cercato di ottenere valori di riferimento dei principali parametri della vascolarizzazione testicolare utilizzando 17 stalloni. Sono stati misurati i diametri dell'arteria testicolare e della vena centrale. Il diametro medio dell'arteria testicolare nell'area del polo caudale del testicolo era di 4,5mm e compreso tra 2,5 e 5,3 mm. La vena centrale è stata misurata nella parte media del testicolo ed il più delle volte è stata identificata nel terzo dorsale o, meno frequentemente, nella metà superiore del testicolo. Il suo diametro medio era di 2,8 mm con un range tra 1,8 e 5,4 mm. Uno studio successivo<sup>(73)</sup> dello stesso gruppo di ricercatori ha valutato 100 stalloni sani e 13 stalloni ipofertili ed è stato riscontrato che il varicocele costituiva l'anomalia maggiormente presente con un'incidenza del 9% negli stalloni sani e del 15% negli stalloni ipofertili. All'esame ecografico il varicocele si caratterizzava per la presenza di aree irregolari solitamente nella parte periferica del cordone spermatico senza segnali di flusso sanguigno pulsatile. La dimensione media del varicocele era di 15,5 mm con un range compreso tra 8 e 24 mm. In uno studio di Pozor e McDonnell<sup>(52)</sup> del 2004 sono stati stabiliti i valori di riferimento degli indici del flusso sanguigno nei testicoli di stallone (PSV, EDV, PI e RI) a livello sia del cordone spermatico sia dell'arteria marginale. Gli indici considerati sono stati correlati con l'età e gli

stalloni anziani presentavano nella parte convoluta dell'arteria testicolare valori più bassi di EDV e valori superiori di RI rispetto a stalloni tra 11 e 15 anni di età.

Uno studio di Boyd e collaboratori<sup>(100)</sup> ha analizzato l'effetto della stagione sul flusso testicolare in 5 stalloni adulti fertili. Gli stalloni sono stati valutati durante l'inverno, la primavera, l'estate e l'autunno sempre tra le 13.00 e le 15.00 così da evitare l'effetto di una possibile fluttuazione diurna del flusso ematico testicolare. Nello studio si evidenziava un significativo aumento del flusso ematico testicolare nei mesi primaverili rispetto a quelli invernali. Questo effetto iniziava a declinare già nel mese di luglio. Sono state inoltre dimostrate correlazioni positive tra la concentrazione di testosterone ed il diametro dell'arteria testicolare, il TABF e la frequenza di TABF. La concentrazione di estradiolo era significativamente correlata con EDV, PI, RI ed età. In un altro studio di Pozor e collaboratori<sup>(101)</sup> sono stati utilizzati 5 stalloni cui venivano somministrate 5 dosi crescenti di hCG a distanza di una settimana l'una dall'altra. Gli stalloni venivano esaminati appena prima del trattamento e ad 1 ora, 72 ore e 7 giorni dopo il trattamento<sup>(101)</sup>. Nello studio le concentrazioni di testosterone nel siero ematico venivano determinate mediante chemiluminescenza. Si riscontrava un notevole incremento nella perfusione testicolare (TAM E TABFR) un'ora dopo la somministrazione della più alta dose di hCG (6000 IU). Questo effetto calava a partire dalle 72 ore. Non vi era una

alterazione di alcun parametro a distanza di 7 giorni dalle somministrazioni. Nello studio la concentrazione di testosterone aumentava significativamente dopo ogni somministrazione di hCG. Questo effetto era ancora presente a 72 ore dopo la somministrazione di 2500 IU di hCG e significativamente maggiore dopo la somministrazione di 6000 IU di hCG. Vi era una correlazione statisticamente significativa tra la concentrazione di testosterone e PSV, EDV, TAM, TABF e TABFR ( $P < 0,001$ ). Questi risultati suggeriscono che il trattamento con una singola somministrazione di 6000 IU di hCG potrebbe essere utile nell'aumentare la perfusione testicolare nei testicoli degli stalloni<sup>(101)</sup>. I testicoli necessitano di una corretta irrorazione per poter esplicare una corretta spermatogenesi e sono organi particolarmente sensibili all'interruzione del supporto nutritivo che avviene principalmente per via ematogena<sup>(106)</sup>. Il testicolo riceve il supporto ematico mediante un'arteria testicolare estremamente lunga<sup>(107)</sup>, con una elevata resistenza del flusso che causa una pressione capillare intratesticolare più bassa rispetto a qualsiasi altro organo e solo lievemente più elevata della pressione venosa<sup>(108)</sup>. L'alta richiesta metabolica dei tubuli seminiferi, che sono esposti a queste particolari condizioni di bassa pressione e bassa tensione dell'ossigeno, viene generalmente assicurata dalla vascolarizzazione che in condizioni normali è capace di supportare i testicoli con una sufficiente quantità di nutrienti ed ossigeno<sup>(106)</sup>. Diversi riscontri suggeriscono che questo organo è particolarmente suscettibile alle alterazioni del sistema vascolare e il malfunzionamento testicolare potrebbe

essere causato da un'alterazione moderata dell'apporto sanguigno<sup>(107,109)</sup>. La valutazione della funzione testicolare è un aspetto dell'andrologia cui i veterinari vanno incontro di routine e viene generalmente valutata mediante analisi del seme<sup>(110)</sup>. In medicina umana è stato riportato che la valutazione del flusso ematico testicolare è capace di predire la funzione testicolare e quindi la spermatogenesi<sup>(111)</sup> ed è utile per differenziare varie cause di dispermia<sup>(112,113)</sup>. Inoltre Herwin e collaboratori<sup>(114)</sup> hanno dimostrato che la qualità del seme dipende dalla perfusione tissutale all'interno del testicolo. In campo veterinario un recente studio di Zelli e colleghi<sup>(110)</sup> ha correlato le caratteristiche dell'arteria testicolare con i principali parametri seminali utilizzando 5 cani di età compresa tra 3 e 5 anni. Nello studio la PSV era positivamente correlata con il volume testicolare bilaterale e negativamente con gli spermatozoi vivi. Inoltre si sottolineava la correlazione negativa e significativa tra i parametri RI e PI e la motilità totale e progressiva al momento del prelievo, dopo 24, 48 e 72 ore nel seme refrigerato. Gli autori giustificavano il risultato ottenuto affermando che, essendo RI e PI inversamente correlate con la perfusione ematica, più questi indici sono bassi e più è efficiente la spermatogenesi. La pressione capillare e la tensione dell'ossigeno nel testicolo sono notevolmente basse e, di conseguenza, la spermatogenesi è adattata ad un ambiente semi-ipossico con il vantaggio di evitare il danno agli spermatozoi da parte dei radicali dell'ossigeno<sup>(115-117)</sup>. Inoltre gli stadi iniziali della spermatogenesi sono sensibili ad una riduzione del flusso sanguigno<sup>(106)</sup> ed il trattamento di cani con farmaci in grado di

determinare ipotensione può indurre un danno ai tubuli seminiferi<sup>(118)</sup>. Hsu e colleghi<sup>(119)</sup> hanno riferito che una diminuzione del flusso arterioso testicolare causa una diminuzione della concentrazione e dell'apporto energetico da parte dei nucleotidi determinando un'alterata spermatogenesi da riferirsi ad un difetto metabolico a livello mitocondriale. Come già visto negli uomini<sup>(111)</sup> anche nei cani RI e PI sembrano essere dei potenziali marker della qualità seminale. È stato inoltre evidenziato nei cavalli che i glicocorticoidi agiscono sulla perfusione tissutale mediante un'azione diretta sulla muscolatura liscia vascolare e indirettamente causando aumentando l'IR<sup>(138)</sup>. Tali riscontri si sono avuti soprattutto in corso di laminite di natura endocrina. Inoltre sia il betametassone sia l'idrocortisone potenziano le azioni vasocostrittrici delle catecolamine epinefrina, norepinefrina e serotonina sui grossi vasi digitali<sup>(137)</sup>. Risultati di laboratorio di Johnson e collaboratori<sup>(139)</sup> portano a pensare che il desametasone e il triamcinolone agiscano sulle cellule della muscolatura liscia vascolare determinando un incremento della contrattilità e, potenzialmente, contribuendo a una condizione di ridotto flusso ematico.

### **2.3 DOSAGGI ORMONALI**

Alcuni stati di ipofertilità nello stallone sono riconducibili a disfunzioni ormonali in soggetti anziani<sup>(120)</sup>. Comunque uno squilibrio ormonale associato ad una degenerazione testicolare è difficile da gestire e la condizione è



generalmente irreversibile in particolare se la causa del problema non è conosciuta<sup>(120)</sup>. Questi stalloni rientrano nella categoria dell'infertilità/ipofertilità idiopatica<sup>(120)</sup>. Lo squilibrio ormonale potrebbe essere causa o risultato della disfunzione e degenerazione testicolare e gli stalloni con disfunzione testicolare idiopatica mostrano inizialmente una bassa motilità spermatica ( $\leq 20-30\%$  motilità progressiva) e morfologia spermatica scadente ( $< 60\%$  morfologia normale) eventualmente accompagnate da un lieve alterazione della consistenza testicolare<sup>(121,122)</sup>. Secondo Roser<sup>(120)</sup> gli stalloni ipofertili presentano percentuali di gravidanza per ciclo inferiori al 20-30% rispetto ai soggetti sani che superano il 50% e una percentuale di gravidanza per stagione inferiore al 60% al cospetto di una percentuale superiore all' 80% nei soggetti fertili). Alcuni stalloni ipofertili non mostrano inizialmente uno squilibrio ormonale ma, effettuando una biopsia testicolare, è possibile riscontrare un declino dell'inibina intratesticolare<sup>(123)</sup>. Al progredire della condizione i segni clinici divengono più evidenti ed includono una diminuzione delle dimensioni testicolari, un parenchima testicolare più soffice o più duro del normale, un calo del numero totale degli spermatozoi per eiaculato, una bassa DSO per volume di parenchima testicolare, un aumentato numero di cellule spermatogene tonde immature e/o cellule giganti multinucleate ed un generale declino della qualità del seme<sup>(124-129)</sup>. In questi stalloni si rileva spesso un calo dei livelli di inibina ed estradiolo  $17\beta$  in circolo ed un aumento dell'FSH seguito da quello dell'LH mentre il testosterone in circolo tende a declinare in maniera marcata solo

successivamente<sup>(121,122)</sup>. In alcuni casi può essere sufficiente la valutazione dei livelli ormonali basali come in stalloni azoospemici che presentavano in uno studio di Sato e colleghi<sup>(130)</sup> del 1981 bassi livelli di testosterone. Uno studio di Inoue e collaboratori<sup>(131)</sup> indicava il testosterone e gli estrogeni come buoni marker per la diagnosi di stalloni ipofertili mentre altri studi riportavano che FSH ed estrogeni fossero più indicati<sup>(121,132)</sup>. Sono stati Burns e Douglas<sup>(134)</sup> nel 1985 ad associare per la prima volta elevate concentrazioni di FSH e stati di ipofertilità. Tuttavia potrebbe essere utile effettuare il test di stimolazione del GnRH dove una dose o dosi intermittenti di analoghi del GnRH vengono somministrate per valutare la risposta ipofisaria e testicolare<sup>(132,134)</sup>. Nello studio di Inoue e collaboratori<sup>(131)</sup> stalloni sottoposti a un trattamento ripetuto con analoghi del GnRH mostravano risposte differenti tra stalloni fertili ed ipofertili a livello sia ipofisario sia testicolare e ciò veniva attribuito alla stagione e alle condizioni delle gonadi. Come visto da Roser e Hughes<sup>(132)</sup> l'ipofisi e i testicoli degli stalloni fertili apparivano essere più sensibili alla somministrazione del GnRH durante la stagione non riproduttiva che non in quella riproduttiva al contrario degli stalloni ipofertili che non presentavano una risposta adeguata al farmaco durante tutto l'anno. In un altro studio<sup>(134)</sup> è stato riscontrato che stalloni ipofertili trattati con una singola dose di GnRH durante la stagione non riproduttiva presentavano una corretta risposta da parte dell'LH mentre la produzione del testosterone era inferiore rispetto a stalloni sani. In uno studio di Roser del 1995<sup>(122)</sup> un gruppo di stalloni sterili presentava una scadente risposta

del testosterone all' hCG mentre in un altro studio<sup>(135)</sup> non si evidenziavano differenze in termini di risposta ipofisaria tra stalloni fertili, ipofertili e sterili ad un anno dalla castrazione e stimolati o meno da una terapia steroidea o dopo trattamento con GnRH. Questi due studi indirizzano a pensare che l'alterazione che conduce ad uno stato di ipofertilità sia da localizzare a livello testicolare. Si ritiene che si verifichi un'alterazione del sistema paracrino e che questo coinvolga soprattutto l'ormone inibina. Ciò è stato ipotizzato in quanto non è stata riscontrata alcuna alterazione nelle cellule del Leydig per quanto riguarda il numero dei recettori e l'affinità recettoriale per l'LH<sup>(129)</sup>, indirizzando in tal modo verso l'ipotesi di un disturbo intracellulare, ed anche in quanto sono stati evidenziati bassi livelli di inibina intratesticolare in stalloni che mostravano i primi segnali di un calo della fertilità<sup>(123)</sup>.

Gordon Baker nel 1998<sup>(136)</sup> ha segnalato la sindrome di Cushing tra le patologie in grado di determinare una alterazione dei parametri riproduttivi nell'uomo analogamente ai tumori ormono-secernenti a carico della ghiandola surrenale e alla somministrazione di corticosteroidi. Nel cavallo, quella che nell'uomo è la sindrome di Cushing, prende il nome di disfunzione della pars intermedia dell'ipofisi (PPID) e necessita di una diagnosi dapprima clinica e poi su base ormonale<sup>(140)</sup>. La conferma della patologia in corso avviene mediante diversi test ormonali<sup>(140)</sup>. Il dosaggio della concentrazione di cortisolo plasmatico non rappresenta da solo un valido test diagnostico in quanto, seppure

l'iperadrenocorticismo si accompagna spesso a valori elevati di cortisolo basale, tuttavia ciò non è sempre vero<sup>(140)</sup>. Il test di soppressione mediante dexamethasone (DST) viene considerato il test di elezione e Dybdal e colleghi<sup>(141)</sup> hanno evidenziato che si ottengono risultati più attendibili effettuando un prelievo basale di dexamethasone nel tardo pomeriggio (ore 17.00), somministrando immediatamente del dexamethasone ad un dosaggio di 40µg/kg IM e valutando le concentrazioni di cortisolo plasmatico 15-19 ore dopo (ore 8.00 – 12.00). Nello studio di Dybdal<sup>(141)</sup> solo 2 cavalli con PPID sui 43 dello studio presentavano concentrazioni di cortisolo inferiori a 1µg/dl dopo 15 ore mentre tutti i 43 cavalli presentavano valori inferiori a 1µg/dl alle 19 ore rispetto ai valori dei 18 cavalli del gruppo di controllo che presentavano valori inferiori a 1µg/dl in entrambi i momenti. Una variante a questo studio viene proposta da Schott e colleghi<sup>(140)</sup> con un singolo prelievo tra le 17 e le 19 ore dopo la somministrazione del farmaco. Sebbene il DST rappresenti il test endocrinologico più affidabile al momento, in realtà possono verificarsi sia casi di falsi positivi sia di falsi negativi ed ogni caso clinico dovrebbe essere valutato singolarmente o supportato da ulteriori test diagnostici<sup>(140)</sup>. Un altro test diagnostico è rappresentato dalla concentrazione plasmatica dell'ACTH endogeno in quanto cavalli affetti da PPID presentano un caratteristico incremento dei livelli plasmatici di questo ormone<sup>(140)</sup>. Tuttavia per una corretta valutazione è necessario che il test venga effettuato da laboratori che utilizzano kit diagnostici specifici per la valutazione su plasma equino<sup>(140)</sup>. Un altro test di

interesse pratico è rappresentato dalla valutazione dell'insulinemia in quanto il cortisolo e l'insulina presentano azioni antagoniste sul metabolismo e l'iperinsulinemia viene spesso attribuita ad un eccesso di cortisolo in circolo nei soggetti affetti da PPID<sup>(140)</sup>. Tuttavia la valutazione dell'insulinemia non permette di effettuare diagnosi con un singolo campione in quanto i livelli di insulina presentano notevoli fluttuazioni<sup>(140)</sup>. Nei soggetti sani non sottoposti a stress o dolore, come nel caso di forme di laminitite acuta, le concentrazioni sieriche di insulina a digiuno possono presentare variazioni legate ai range di riferimento dei diversi laboratori. Nell'Università del Tennessee si ritiene indicativo di iperinsulinemia un valore superiore a 20 $\mu$ U/ml mentre un cut-off di 100 $\mu$ U/ml viene utilizzato per indicare una condizione di grave iperinsulinemia<sup>(142)</sup>. In uno studio di Carter e colleghi<sup>(143)</sup> è stato utilizzato un cut-off di 32 $\mu$ U/ml per la valutazione del rischio di laminitite nei ponies mentre Walsh e colleghi<sup>(144)</sup> hanno valutato la sindrome metabolica equina mediante un cut-off di 70 $\mu$ U/ml. Il test di stimolazione mediante ACTH, il test di stimolazione mediante l'ormone rilasciante la tireotropina, la valutazione della concentrazione del cortisolo salivare e la valutazione della ratio cortisolo:creatinina nelle urine presentano invece un limitato impiego diagnostico e non vengono comunemente utilizzati per la valutazione dei cavalli con sospetta PPID<sup>(140)</sup>.

1. Baumber-Skaife J. Evaluation of semen. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. and Varner D.D. Equine Reproduction, II edn, 2011, chapter 124, pp. 1278-1291.
2. Turner R.M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? J Androl 2003;24:790-803.
3. Blanchard T.L., Varner D.D. Scumacher J., Love C.C., Brinsko S.P., Rigby S.L. Semen collection and artificial insemination. In: Blanchard T.L., Varner D.D. Scumacher J., Love C.C., Brinsko S.P., Rigby S.L. (eds) Manual of Equine Reproduction, 2<sup>nd</sup> edn. St.Louis: Mosby, 2003; pp. 131-42.
4. Estrada A.J. and Samper J.C. Evaluation of raw semen. In: Samper J.C., Pycock J.F. and McKinnon A.O. (eds) Current Therapy in Equine Reproduction. St. Louis: Saunders, 2006; pp. 253-7.
5. Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Brinsko S.P. and Rigby S.L. Examination of the stallion for breeding soundness. In: Blanchard T.L., Varner D.D., Schumacher J., Love C.C., Brinsko S.P. and Rigby S.L. (eds) Manual of Equine Reproduction, 2nd edn. St.Louis: Mosby, 2003; pp. 143-64.

6. Card C. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* 2005;64:558-67.
7. Pickett B.W., Anderson E.W., Roberts A.D. and Voss J.L. Freezability of first and second ejaculates of stallion semen. In: *Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Madrid, Spain, vol. 5, 1980, pp. 339-47.*
8. Friedman R., Scott M., Heath S.E., Hughes J.P., Daels P.F. and Tran T.Q. The effects of increase testicular temperature on spermatogenesis in the stallion. *J Reprod Fertil suppl* 1991;44:127-34.
9. Blanchard T.L., Jorgensen J.B., Varner D.D., Forrest D.W. and Evans J.W. Clinical observations on changes in concentrations of hormones in plasma of two stallions with thermally-induced testicular degeneration. *J Equine Vet Sci* 1996;16:195-201.
10. Turner R.M.O. Pathogenesis, diagnosis, and management of testicular degeneration in stallions. *Clin Tech Equine Pract* 2007;6:278-84.
11. Brinsko S.P., Varner D.D., Love C.C., Blanchard T.L., Day B.C. and Wilson M.E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of

- fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology* 2005;63:1519-27.
- 12.Samper J.C., Garcia A. and Burnett K. The effect of different lubricants on longevity of motility and velocity of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2007;68:496.
- 13.Sieme H., Katila T. and Klug E. Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 2004;61:769-84.
- 14.Varner D.D., Scanlan C.M., Thompson J.A., Brumbaugh G.W., Blanchard T.L., Carlton C.M. and Johnson L. Bacteriology of preserved stallion semen and antibiotics in semen extenders. *Theriogenology* 1998;50:559-73.
- 15.Aurich C. and Spersger J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2007;67:912-18.
- 16.Squires E.L., Badzinski S.L., Amann R.P., McCue P.M. and Nett T.M. Effects of altrenogest on total scrotal width, seminal characteristics, concentrations of LH and testosterone and sexual behavior of stallions. *Theriogenology* 1997;48:313-28.
- 17.Burger D., Janett F., Vidament M., Stump R., Fortier G., Imboden I. and Thun R. Immunization against GnRH in adult stallions: effects on semen



- characteristics, behavior and shedding of equine arteritis virus. *Anim Reprod Sci* 2006;94:107-11.
- 18.Jasko D.J. Evaluation of stallion semen. *Vet Clin North Am Equine Pract* 8:129-148, 1992.
- 19.Colenbrander B., Puyk H., Zandee A.R. et al. Evaluation of the stallion for breeding. *Acta Vet Scand Suppl* 88:29-37, 1992.
- 20.Seed J., Chapin R.E., Clegg E.D. et al. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report. ILSI Risk Science Institute Expert Working Group on Sperm Evaluation. *Reprod Toxicol* 10:237-244, 1996.
- 21.Card C. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* 64:558-567, 2005.
- 22.Veeramachaneni D.N., Moeller C.L. and Sawyer H.R. Sperm morphology in stallions: ultrastructure as a functional and diagnostic tool. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22:683-692, 2006.
- 23.Brito L.F.C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. *Clinical Techniques in Equine Practice* 6:249-264, 2007.

24. Dowsett K.F. and Knott L.M. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 46:397-412, 1996.
25. Dowsett K.F., Osborne H.G. and Pattie W.A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 22:463-472, 1984.
26. Love C.C., Varner D.D. and Thompson J.A. Intra and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 56:93-100, 2000.
27. Jasko D.J., Lein D.H. and Foote R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 197:389-394, 1990.
28. Chenoweth P.J. Genetic sperm defects. *Theriogenology* 64:457-468, 2005.
29. Barth A. and Oko R. (eds): *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames, IA, Iowa State University Press, 1989.
30. Hurtgen J.P. and Johnson L.A. Fertility of stallions with abnormalities of the sperm acrosome. *J Reprod Fertil Suppl* 32:15-20, 1982.
31. Veeramachaneni D.N., Moeller C.L., Pickett B.W. et al. On processing and evaluation of equine seminal samples for cytopathology and fertility

- assessment: the utility of electron microscopy. *J Equine Vet Sc* 13:207-215, 1993.
32. Varner D.D., Brinsko S.P., Blanchard T.L. et al. Subfertility in stallions associated with spermatozoal acrosome dysfunction, in 2001 Proceedings American Association of Equine Practitioners Conference, 2001, pp 227-228.
33. Pesch S., Bostedt H., Failing K. et al. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Anim Reprod Sci* 91:285-298, 2006.
34. Barth A.D. and Bowman P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can Vet J* 35:93-102, 1994.
35. Brito L.F., Silva A.E., Barbosa R.T. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* bulls. *Anim Reprod Sci* 79:1-15, 2003.
36. Thundathil J., Palasz A.T., Mapletoft R.J. et al. An investigation of the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 57:35-50, 1999.

37. Pilip R., Del Campo M.R., Barth A.D. et al. In vitro fertilizing characteristics of bovine spermatozoa with multiple nuclear vacuoles: a case study. *Theriogenology* 46:1-12, 1996.
38. Thundathil J., Palasz A.T., Barth A.D. et al. Fertilization characteristics and in vitro embryo production with bovine sperm containing multiple nuclear vacuoles. *Mol Reprod Dev* 50:328-333, 1998.
39. Held J.P., Prater P. and Stettler M. Spermatozoal head defect as a cause of infertility in a stallion. *J Am Vet Med Assoc* 199:1760-1761, 1991.
40. Hellander J.C., Samper J.C. and Crabo B.G. Fertility of a stallion with low sperm motility and a high incidence of an unusual sperm tail defect. *Vet Rec* 128:449-451, 1991.
41. Heath E., Aire T. and Fujiwara K. Microtubular mass defect of spermatozoa in the stallion. *Am J Vet Res* 46:1121-1125, 1985.
42. Alvarenga F.M., Alvarenga M.A. Microtubular defect in equine spermatozoa associated with infertility. *Equine Vet J* 29:487-489, 1997.
43. Zibrin M. and Tomajkova E. Ultrastructure of double-headed spermatozoa in bulls and stallions. *Z Mikrosk Anat Forsch* 88:511-522, 1974.

44. Colenbrander B., Gadella B.M. and Stout T.A.E. The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod Domest Anim* 38:305-311, 2003.
45. Setchell B.P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil* 114:179-194, 1998.
46. Blanchard T., Varner D., Johnson L. et al. Testicular and hormonal changes in stallions with thermally induced testicular degeneration. *J Reprod Fertil Suppl* 56:51-59, 2000.
47. Staempfli S., Janett F., Burger D. et al. Effect of exercise and suspensory on scrotal surface temperature in the stallion. *Theriogenology* 66:2120-2126, 2006.
48. Janett F., Burkhardt C., Burger D. et al. Influence of repeated treadmill exercise on quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* 65:1737-1749, 2006.
49. Nagata S., Kurosawa M., Mima K. et al. Effects of anabolic steroid (19-nortestosterone) on the secretion of testicular hormones in the stallion. *J Reprod Fertil* 115:373-379, 1999.

50. Squires E.L., Berndtson W.E., Hoyer J.H. et al. Restoration of reproductive capacity of stallions after suppression with exogenous testosterone. *J Anim Sci* 53:1351-1359, 1981.
51. Squires E.L., Todter G.E., Berndtson W.E. et al. Effect of anabolic steroids on reproductive function of young stallions. *J Anim Sci* 54:576-582, 1982.
52. Koskinen E., Marttila P. and Katila T. Effect of 19-norandrostenediol laurate on semen characteristics of colts. *Acta Vet Scand* 38:41-50, 1997.
53. van der Holst W. A study of the morphology of stallion semen during the breeding and non-breeding seasons. *J Reprod Fertil Suppl* 87-89, 1975.
54. Blottner S., Warnke C., Tuchscherer A. et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. *Anim Reprod Sci* 65:75-88, 2001.
55. Bielanski W., Dudek E., Bittmar A. et al. Some characteristics of common abnormal forms of spermatozoa in highly fertile stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 32:21-26, 1982.
56. Janett F., Thun R., Niederer K. et al. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 60:453-461, 2003.

57. Janett F., Thun R., Bettschen S. et al. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Anim Reprod Sci* 77:213-221, 2003.
58. Naden J., Amann R.P. and Squires E.L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *J Reprod Fertil* 88:167-176, 1990.
59. Turner R.M. Testicular degeneration in stallions, in 2002 Proceeding Society for Theriogenology Conference, 2002.
60. Pickett B.W. Reproductive evaluation of the stallion, in McKinnon AO, Voss JL (eds): *Equine Reproduction*. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993, pp 755-768.
61. van Eldik P., van der Waaij E.H., Ducro B. et al. Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology* 65:1159-1170, 2006.
62. Pickett B.W., Voss J.L., Bowen R.A., Squires E.L. and McKinnon A.O. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallion. *Proc Am Assoc Eq Prac* 1987;33:487-518.
63. Pickett B.W., Voss J.L., Bowen R.A., Squires E.L. and McKinnon A.O. Comparison of seminal characteristics of stallions that passed or failed

- seminal evaluation. In: Proceedings of 11<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination 1988; vol 3, pp. 380.
64. Pozor M.A. Evaluation of testicular vasculature in stallions. Clin Tech Equine Pract 6:271-277, 2007.
65. Viguera R.M., Reyes G., Rojas-Castaneda J. et al. Testicular torsion and its effects on the spermatogenic cycle in the contralateral testis of the rat. Lab Anim 38:313-320, 2004.
66. Bergh A., Collin O. and Lissbrant E. Effects of acute graded reduction in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. Biol Reprod 64:13-20, 2001.
67. Paduch D.A. and Niedzielski J. Repair versus observation in adolescent varicocele: a prospective study. J Urol 158:1128-1132, 1997.
68. Redmon J.B., Carey P., Pryor J.L. Varicocele: the most common cause of male factor infertility? Hum Reprod Update 8:53-58, 2002.
69. Oguzkurt P., Okur D.H., Tanyel F.C. et al. The effects of vasodilation and chemical sympathectomy on spermatogenesis after unilateral testicular torsion: a flow cytometric DNA analysis. Br J Urol 82:104-108, 1998.



70. Tarhan F., Erbay E., Erdogʻan E. et al. Effects of unilateral testicular torsion on the blood flow of contralateral testis. *Acan J Urol Nephrol* 34:229-232, 2000.
71. Kass E.J., Stork B.R., Steinert B.W. Varicocele in adolescence induces left and right testicular volume loss. *BJU Int* 87:499-501, 2001.
72. Meacham R.B., Townsend R.R., Rademacher D. et al. The incidence of varicoceles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. *J Urol* 51:1535-1538, 1994.
73. Pozor M. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproductive tract. *Theriogenology* 64:505-509, 2005.
74. Pascoe J.R., Ellenburg T.V., Culbertson M.R. et al. Torsion of the spermatic cord in a horse. *J Am Vet Med Assoc* 178:242-245, 1981.
75. Threlfall W.R., Carleton C.L., Robertson J. et al. Recurrent torsion of the spermatic cord and scrotal testis in a stallion. *J Am Vet Med Assoc* 196:1641-1643, 1990.
76. Trotter G.W. Unilateral castration, in McKinnon AO, Voss JL (eds): *Equine Reproduction*. Philadelphia, PA, Lea & Febiger, 1993, pp 921-924.

77. Kay G.W., Grobbelaar J.A.N. and Hattingh J. Heritable testicular hypoplasia in Nguni (*Bos indicus*) bulls: vascular characteristics and testosterone production. *J Reprod Fertil* 96:537-547, 1992.
78. Kay G.W., Grobbelaar J.A.N. and Hattingh J. Effect of surgical restriction of growth of the testicular artery on testis size and histology in bulls. *J Reprod Fertil* 96:549-553, 1992.
79. Markey C.M., Jequier A.M., Meyer G.T. et al. Relationship between testicular morphology and sperm production following ischaemia in the ram. *Reprod Fertil Dev* 7:119-128, 1995.
80. Dubinsky T., Chen P. and Maklad N. Color-flow and power Doppler imaging of the testes. *World J Urol* 16:35-40, 1998.
81. Herbener T.E. Ultrasound in the assessment of the acute scrotum. *J Clin Ultrasound* 24:405-421, 1996.
82. Górecka-Szyld B. Assessing the value of colour Doppler ultrasound investigations in diagnostics of most frequently occurring diseases of scrotal pouch. *Ann Acad Med Stetin* 45:227-237, 1999.
83. Pavlica P. and Barozzi L. Imaging of the acute scrotum. *Eur Radiol* 11:220-228, 2001.

84. Farriol V.G., Comella X.P., Agromayor E.G. et al. Grey-scale and power Doppler sonographic appearances of acute inflammatory diseases of the scrotum. *J Clin Ultrasound* 28:67-72, 2000.
85. Horstman W.G., Melson G.L., Middleton W.D. et al. Testicular tumors: findings with color Doppler US. *Radiology* 185:733-737, 1992.
86. Sriprasad S., Kooiman G.G., Muir G.H. et al. Acute segmental testicular infarction: differentiation from tumour using high frequency colour Doppler ultrasound. *Br J Radiol* 74:965-967, 2001.
87. Sidhu P.S. Clinical and imaging features of testicular torsion: role of ultrasound. *Clin Radiol* 54:343-352, 1999.
88. Nowicki A. (ed): *Ultrasound diagnostics. Ultrasonografia Praktyczna*, vol 12, Gdansk 2000.
89. Krzanowski M. and Plichta A. (eds): *Atlas of Vascular Ultrasonography*. Krakow, Medycyna Praktyczna, 2000.
90. Gumbsch P., Gabler C., Holtzmann A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Vet Rec* 151:140-144, 2002.

91. Rifkin M.D., Needleman L., Pasto M. et al. Evaluation of renal transplant rejection by duplex Doppler examination: value of the resistive index. *AJR Am J Roentgenol* 148:759, 1987.
92. Jee W.H., Choe J.K., Byun J.Y. et al. Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease. *Acta Radiol* 38:1026-1030, 1997.
93. Wielgos M., Bablok L., Fracki S. et al. Doppler flow measurements in testicular artery of aging males. *Gin Pol* 69:537-540, 1998.
94. Wielgos M., Fracki S., Bablok L. et al. Testicular artery Doppler flow measurements in patients with the Klinefelter syndrome. *Med Sci Monit* 1197-1199, 1999.
95. Ekerhovd E. and Westlander G. Testicular sonography in men with Klinefelter syndrome shows irregular echogenicity and blood flow of high resistance. *J Assit Reprod Genet* 19:517-522, 2002.
96. El-Etreby M.F. Morphological studies on the peripheral circulation of the genital organs in buffaloes with special reference to spontaneous arteriosclerosis in animals. *Zbl Vet Med, Reihe A, Bd 16, Heft 10*:865-893, 1969.
97. Regadera J., Nistal M. and Paniagua R. Testis, epididymis, and spermatic cord in elderly men. *Arch Pathol Lab Med* 109:663-667, 1985.

98. Tarhan S., Gumus B., Gunduz I. et al. Effect of varicocele on testicular artery blood flow in men: color Doppler investigation. *Scand J Urol Nephrol* 37:38-42, 2003.
99. Pozor M.A. and McDonnell S.M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology* 61:799-810, 2004.
100. Boyd A., Pozor M., Bailey C.S. et al. Effect of seasonality on testicular blood flow in mature stallions. *Anim Reprod Sci* 94:144-145, 2006.
101. Pozor M., Macpherson M.L., Troedsson M. et al. Effect of a single administration of human chorionic gonadotropin (hCG) on testicular blood flow in stallions. *Anim Reprod Sci* 94:146-147, 2006.
102. Love C.C., Garcia M.C., Riera F.R. et al. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J Reprod Fert Suppl* 44:99-105, 1991.
103. Love C.C., Garcia M.C., Riera F.R. et al. Use of testicular volume to predict daily sperm output in the stallion. *Proceedings of the 36th Conference of the AAEP, Lexington, KY, 1991, p 15.*
104. Pozor M. and Kolonko D. Morphological and clinical studies on testicular artery of the stallion. *Medycyna Wet* 57:822-826, 2000.

105. Harnik S. Investigations on the anatomical and clinical aspects of testicular vasculature in stallions. Master Thesis, University of Agriculture, Krakow 2002.
106. Bergh A., Collin O. and Lissbrant E. 2001. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction* 64, 13–20.
107. Bergh A. and Damber J.E., 1993. Vascular controls in testicular physiology. In: de Kretser, D.M. (Ed.), *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, New York, pp. 439–468.
108. Sweeney T.E., Rozum J.S., Desjardins C. and Gore R.W. 1991. Microvascular pressure distribution in the hamster testis. *American Journal of Physiology* 260, 1581–1589.
109. Damber J.E. and Bergh A. 1992. Testicular microcirculation a forgotten essential in andrology. *International Journal of Andrology* 15, 285–292.

110. Zelli R., Troisi A., Elad Ngonput A., Cardinali L. and Polisca A.

Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Research in Veterinary Science* 95 (2013) 632–637.

111. Pinggera G.M., Mitterberger M., Bartsch G., Strasser H., Gradl J.,

Aigner F., Pallowein L. and Frauscher F. 2008. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography measurements as a predictor of spermatogenesis. *British Journal of Urology International* 101, 722–726.

112. Atilla M.K., Sargin H., Yilmaz Y., Odabas Ö., Keskin A. and Aydin S.

1997. Undescended testes in adults: clinical significance of resistive index values of the testicular artery measured by Doppler ultrasound as a predictor of testicular histology. *Journal of Urology* 158, 841–843.

113. Biagiotti G., Cavallini G., Modenini G., Vitali G. and Gianoroli L.

2002. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the

- main testicular artery. *British Journal of Urology International* 90, 903–908.
114. Herwig R., Tosun K., Pinggera G.M., Soelder E., Moeller K.T., Pallwein L., Frauscher E., Bartsch G., Wildt L. and Illmensee K. 2004. Tissue perfusion essential for spermatogenesis and outcome of testicular sperm extraction (TESE) for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 175–180.
115. Setchell B.P. Maddocks S. and Brooks D.E. 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, second ed. Raven Press, New York, pp. 1063–1175.
116. Max B. 1992. This and that hair pigments, the hypoxic basis of life and the Virgilian journey of the spermatozoon. *Trends in Pharmacological Sciences* 13, 272–276.
117. Aitken R.J. 1999. The human spermatozoon: a cell in crisis? *Journal of Reproduction and Fertility* 115, 1–7.
118. Nolte T., Harleman J.H. and Jahn W. 1995. Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 47, 267–286.



119. Hsu H.S., Chang L.S., Chen M.T. and Wei Y.H. 1994. Decreased blood flow and defective energy metabolism in the varicocele-bearing testicles of rats. *European Urology* 25, 71–75.
120. Roser J.F. Diagnostics and therapeutics for stallions with declining fertility: an endocrine-paracrine-autocrine approach. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E. and Varner D.D. *Equine reproduction*, 2011, 147:1435-1444.
121. Douglas R.H. and Umphenour N. Endocrine abnormalities and hormonal therapy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1992;8:237-49.
122. Roser J.F. Endocrine profiles in fertile, subfertile and infertile stallions: Testicular response to human chorionic gonadotropin in infertile stallions. *Biol Reprod Monogr* 1995;1:661-9.
123. Stewart B.L. and Roser J.F. Effects of age, season and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (Ir) inhibin concentrations in stallions. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15:129-39.
124. Blanchard T.L. and Varner D.D. Testicular degeneration. In: McKinnon A.O. and Voss J.L. (eds) *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993; pp. 858-60.

125. Turner R.M.O. Testicular abnormalities. In: Samper J.C., Pyckock J.F. and McKinnon A.O. (eds) Current Therapy in Equine Reproduction. St. Louis, MO: Saunders Elsevier, 2007; pp. 195-204.
126. Watson E.D., Clarke C.J., Else R.W. and Dixon P.M. Testicular degeneration in 3 stallions. *Equine Vet J* 1994;26:507-10.
127. Blanchard T., Johnson L. and Roser J.F. Increased germ cell loss rates and poor semen quality in stallions with idiopathic testicular degeneration. *J Equine Vet Sci* 2000;20:263-5.
128. Blanchard T.L. and Johnson L. Increased germ cell and reduced germ cell:Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Theriogenology* 1997;47:655-77.
129. Motton D.D. and Roser J.F. HCG binding to the testicular LH receptors is similar in fertile, subfertile and infertile stallions. *J Androl* 1997;18:411-16.
130. Sato K., Miyake M., Tunoda N., Nakagawa A. and Iwamura T. Relationship between the semen characteristics and serum testosterone and estrogen levels in three-year-old colts. *Jpn J Zootech Sci* 1981;52:447.

131. Inoue J., Cerbito W.A., Oguri N., Matsuzawa T. and Sato K. Serum levels of testosterone and oestrogens in normal and infertile stallions. *Int J Androl* 1993;16:155-8.
132. Roser J.F. and Hughes J.P. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. *J Androl* 1992;13:214-23.
133. Burns P.J. and Douglas R.H. Reproductive hormone concentrations in stallions with breeding problems: case studies. *J Equine Vet Sci* 1985;5:40-2.
134. Roser J.F. and Hughes J.P. Dose-response effects of GnRH on gonadotropins and testicular steroids in fertile and subfertile stallions. *J Androl* 1992;13:543-50.
135. Roser J.F., Tarleton M. and Belanger J.M. Pituitary response to steroid replacement therapy in fertile, subfertile and infertile stallions after castration. *J Reprod Fertil Suppl* 2000;56:61-8.
136. Gordon Baker H.W. Reproductive effects of nontesticular illness. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, volume 27 - number 4 - december 1998.

137. Eyre P., Elmes P.J. and Strickland S. Corticosteroid-potentiated vascular responses of the equine digit: A possible pharmacologic basis for laminitis. *Am J Vet Res* 40:135-138, 1979
138. Johnson P.J., Messer N.T., Slight S.H., Wiedmeyer C., Buff P. and Ganjam V.K. Endocrinopathic Laminitis in the Horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, Vol 3, 2004, pp. 45-56.
139. Johnson P.J., Bowles D.K. and Messer N.T. Dexamethasone alters equine digital artery smooth muscle ion channel activity and contractility: Role in glucocorticoid-associated laminitis? *J Vet Int Med* 17:457-458, 2003.
140. Schott H.C. Pituitary pars intermedia dysfunction: equine Cushing's disease. *Vet Clin Equine* 18, 2002, pp. 237–270.
141. Dybdal N.O., Hargreaves K.M., Madigan J.E. et al. Diagnostic testing for pituitary pars intermedia dysfunction in horses. *JAVMA* 1994;204:627–32.
142. Frank N. Equine metabolic syndrome. *Journal of Equine Veterinary Science*, Vol 29, No 5, 2009.
143. Carter R.A., Treiber K.H., Geor R.J., Douglass L. and Harris P.A. Prediction of incipient pasture-associated laminitis from

hyperinsulinaemia, hyperleptinaemia and generalised and localised obesity in a cohort of ponies. *Equine Vet J* 2009;41:171–178.

144. Walsh D.M., McGowan C.M., McGowan T., Lamb S.V., Schanbacher B.J. and Place N.J. Correlation of plasma insulin concentration with laminitis score in a field study of equine Cushing's disease and equine metabolic syndrome. *J Equine Vet Sci* 2009;29:87–94.

## CAPITOLO III

### PARAMETRI RIPRODUTTIVI

#### 3.1 STAGIONE

Lo stallone è un riproduttore stagionale e, generalmente, in corrispondenza della stagione riproduttiva primaverile si verificano cambiamenti nelle caratteristiche seminali e del comportamento sessuale<sup>(1)</sup>. La modulazione stagionale della produzione spermatica influisce fortemente sulla spermatocitogenesi. Durante la stagione riproduttiva si osserva un lieve incremento nel numero degli spermatogoni A1 ed una minore degenerazione degli spermatogoni<sup>(2)</sup>. La degenerazione degli spermatidi avviene principalmente nella stagione non riproduttiva<sup>(2)</sup>. Il numero delle cellule del Sertoli è basso nei soggetti giovani mentre aumenta nei soggetti adulti per poi eventualmente diminuire con l'avanzare dell'età<sup>(2)</sup>. Inoltre il numero delle cellule del Sertoli è inferiore in inverno rispetto all'estate<sup>(2)</sup>. Questa variazione stagionale nel numero delle cellule del Sertoli non è stata riportata in altre specie. L'effetto della stagione è importante per determinare se una valutazione della potenziale fertilità di uno stallone possa essere effettuata durante tutto l'anno ed i risultati ottenuti rapportati alla stagione riproduttiva<sup>(3)</sup>. Uno studio di Pickett e colleghi del 1976 ha analizzato il materiale seminale di 5 stalloni Quarter Horse ottenuto per un anno con un doppio prelievo settimanale a distanza di un'ora<sup>(4)</sup>. Il volume gel-

free medio del primo eiaculato era 58 ml mentre quello dei secondi eiaculati era di 50 ml. Il volume dei primi eiaculati variava tra 45 ml a febbraio e 81 ml a giugno mentre quello dei secondi eiaculati variava da 42 ml a marzo sino a 63 ml a giugno. Ciò rappresentava un incremento di circa il 40% dai mesi invernali al picco della stagione riproduttiva. Il volume totale dei primi eiaculati era in media di 66 ml. Si spaziava dai 45 ml a febbraio ai 104 ml del mese di giugno. I secondi eiaculati invece avevano una media di 52 ml e variavano dai 42 ml del mese di marzo ai 68 ml di giugno. Il volume seminale totale era fortemente influenzato dalla stagione ma la maggior parte delle differenze tra primi e secondi eiaculati era espressione del maggiore volume di gel nei primi eiaculati. Il numero medio di spermatozoi per i primi eiaculati era di 15 miliardi e variava tra 10 miliardi nel mese di gennaio sino a 22 miliardi nel mese di luglio. I secondi eiaculati erano in media di 8 miliardi e variavano tra 5 miliardi a dicembre e 12 miliardi a luglio. Poiché gli stalloni venivano raccolti ogni martedì questo numero di spermatozoi rappresentava una produzione di diversi giorni. Il seme prodotto nei mesi di minor produzione era circa il 50% di quello prodotto nei mesi a più elevata produzione (50% e 39% per i primi e secondi eiaculati rispettivamente). Questo notevole calo stagionale era espressione della diminuita spermatogenesi. La differenza tra primi e secondi eiaculati, in termini di numero di spermatozoi, era del 54.7%. La distanza temporale tra i secondi eiaculati e i successivi primi eiaculati era tuttavia tale da rendere poco

rappresentativo il numero di spermatozoi totali recuperato nei primi eiaculati. Per questo motivo in un altro studio<sup>(5)</sup> sono stati effettuati singoli prelievi giornalieri per un periodo di 10 settimane. Un primo gruppo composto da 4 stalloni venne prelevato dal 27 aprile al 4 giugno e, pensando che l'eventuale picco di produzione spermatica potesse essere successivo alla conclusione dell'esperimento, un secondo gruppo di 6 stalloni venne prelevato l'anno successivo dal 24 aprile al 2 luglio. I primi giorni di prelievo vennero recuperati elevati numeri di spermatozoi. Il numero di spermatozoi raccolti si stabilizzava al 5°-7° giorno di prelievo e nel corso della settimana successiva variava tra 2.6 e 3.6 miliardi<sup>(5)</sup>. La variazione nella produzione spermatica giornaliera del primo gruppo era di 3.2-6.6 miliardi (media = 4.8 miliardi) mentre era di 3.3-5.8 miliardi nel secondo gruppo (media = 4.3 miliardi). I primi 7 eiaculati presentavano una media di 5.3 miliardi per eiaculato in entrambi gli studi. La differenza di circa 2 miliardi per eiaculato tra la prima e la seconda settimana era legata alla deplezione delle riserve spermatiche epididimali. Jasko e colleghi hanno apportato ulteriori dati circa l'effetto stagionale sulle caratteristiche seminali<sup>(6)</sup>. Nel loro studio le concentrazioni spermatiche erano di 147 milioni nel mese di dicembre mentre ad agosto erano di 217 milioni per ml. Johnson e collaboratori<sup>(7)</sup> hanno esaminato l'effetto della stagione e dell'età su 184 stalloni compresi tra 4 e 20 anni. Hanno affermato che il peso del parenchima testicolare e la produzione spermatica giornaliera aumentavano con l'età. Non vi era effetto



dell'età sul numero di cellule del Sertoli mentre tale variazione si poteva riscontrare in funzione della stagione. Stewart e Roser<sup>(8)</sup> hanno condotto uno studio per esaminare l'effetto dell'età, della stagione e dello stato di fertilità sui livelli plasmatici e testicolari dell'ormone. Sono stati coinvolti 51 stalloni sani tra 2 mesi e 25 anni di età. I campioni sono stati prelevati durante la stagione riproduttiva e durante quella non riproduttiva. Il gruppo di stalloni comprendeva 6 stalloni fertili, 3 ipofertili e tre sterili. Hanno dimostrato che l'inibina, l'ormone luteinizzante (LH), il testosterone, l'estradiolo ed estrogeni coniugati aumentavano con la maturazione testicolare con l'incremento maggiore che si verificava tra 1 anno e 2½. Non hanno riscontrato una differenza stagionale nei livelli ormonali del plasma ma hanno attribuito questo fatto alla modalità di campionamento singolo mensile. Lo stato di fertilità degli stalloni non aveva un effetto sui livelli ormonali. Il testosterone tendeva a declinare negli stalloni sterili mentre, negli stessi, l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'LH erano più elevati. Inibina, estradiolo ed estrogeni coniugati presentavano livelli inferiori negli stalloni sterili. Hoffman e Landeck<sup>(9)</sup> hanno ottenuto campioni di seme da 11 stalloni di razza da sella, 7 durante i mesi da gennaio a luglio e 4 durante i mesi da novembre a febbraio. Hanno riportato che estrone, estrone solfato ed estradiolo-17β raggiungevano il picco tra aprile e luglio e che gli estrogeni presentavano i livelli inferiori tra dicembre e febbraio. Gli steroidi testicolari

come il testosterone e l'estrone solfato presentavano livelli rispettivamente 24 e 54 volte più elevati nel plasma ematico rispetto al plasma seminale.

### **3.2 ETA'**

L'età di uno stallone rappresenta uno dei fattori più importanti che influiscono sulla produzione spermatica e sul numero di cavalle che esso può servire<sup>(10-12)</sup>. Il valore di stalloni di tutte le razze ha aumentato in maniera notevole negli ultimi anni e questa situazione ha portato alcuni proprietari ad utilizzare stalloni prima dei 3 anni di età e continuare l'attività il più a lungo possibile<sup>(19)</sup>. In alcuni casi gli stalloni operano ben al di là dei 20 anni di età<sup>(19)</sup>. L'influenza dell'età sulle caratteristiche seminali è stata riportata variare a seconda della caratteristica considerata. Caratteristiche come volume (totale e gel-free) e numero di spermatozoi totali si è visto essere influenzati dall'età mentre altri come il volume del gel, la concentrazione spermatica, il pH e la morfologia spermatica non lo erano<sup>(12,24,32)</sup>. L'età non agisce solo sulle dimensioni testicolari ma anche sul numero di spermatozoi che vengono accumulati negli epididimi<sup>(3)</sup>. Il numero di spermatozoi eiaculati e la qualità di questi determina la fertilità relativa di un eiaculato<sup>(3)</sup>. Il numero di spermatozoi disponibili per l'eiaculazione dipende dalle riserve presenti nella coda dell'epididimo, dotto deferente e ampolle<sup>(10,11,13)</sup>. Gli spermatozoi nella testa e nel corpo dell'epididimo non sono disponibili per

l'eiaculazione. Il numero disponibile per eiaculato è fortemente influenzato dall'intervallo con precedenti eiaculazioni, dimensione testicolare ed età. Gli stalloni che presentano grosse riserve spermatiche nella coda dell'epididimo possono ingravidare un numero maggiore di cavalle in un periodo di tempo più breve rispetto a stalloni con minori riserve<sup>(3)</sup>. È stato condotto uno studio<sup>(11)</sup> per determinare l'effetto dell'età e la frequenza di eiaculazione sulle riserve spermatiche epididimali. Stalloni di razze da corsa venivano posti a riposo sessuale per almeno 12 giorni e successivamente venivano sottoposti a prelievo del seme: un gruppo 5 prelievi a distanza di un'ora, uno 2 prelievi a distanza di un'ora ogni 4 giorni, uno 1 volta ogni 2 giorni ed un altro 1 volta al giorno per almeno 3 settimane. I 54 stalloni sono poi stati castrati su uno o entrambi i lati a partire da 1-2 ore, 24 ore o 12 giorni dopo l'ultima eiaculazione. Le riserve spermatiche di 71 epididimi sono state valutate. La produzione spermatica giornaliera è stata calcolata analizzando il tessuto testicolare. Le riserve spermatiche degli stalloni a riposo aumentavano con l'età. Sebbene non vi fosse un incremento significativo a livello della testa, nel corpo era presente circa due volte il numero di spermatozoi nei soggetti tra 10 e 16 anni (9.5 miliardi) rispetto a quelli tra 2 e 4 anni (4.2 miliardi). Il numero totale di spermatozoi nelle riserve spermatiche degli stalloni tra 2 e 4 anni, tra 5 e 9 e tra 10 e 16 era rispettivamente di 29, 41 e 45 miliardi. Quindi stalloni più vecchi avevano una capacità di stoccaggio maggiore rispetto a stalloni tra 2 e 3 anni di età. Al di là

dell'età la coda dell'epididimo conteneva circa il 62% delle riserve spermatiche e fungeva da sito principale di accumulo. Né l'eiaculazione giornaliera né una serie di 5 eiaculazioni a intervalli di un'ora riducevano il numero di spermatozoi presenti nella testa e nel corpo dell'epididimo. Quindi il transito spermatico attraverso queste porzioni di epididimo che si ritiene siano interessate nella maturazione spermatica non è alterato dalla frequenza di eiaculazione. Comunque eiaculazioni 24 o 48 ore prima di un prelievo seminale riducono le riserve spermatiche della coda del 15-30%. Le dimensioni testicolari, la produzione spermatica giornaliera (DSP) e le riserve spermatiche extragonadiche (EGR) aumentavano per diversi anni dopo la pubertà. Sulla base di questi studi i ricercatori concludevano che DSP e EGR in uno stallone sano di 3 anni dovrebbero essere adeguate a permettere l'utilizzo dello stallone almeno una volta al giorno durante la stagione riproduttiva. La capacità riproduttiva di stalloni più anziani dovrebbe essere adeguata per permettere l'utilizzo almeno 2-3 volte al giorno durante la primavera e l'estate. Per gli stalloni più anziani l'impulso sessuale è il fattore limitante per stabilire il numero di cavalle che possono essere coperte al giorno in monta naturale<sup>(3)</sup>. Nei cavalli la DSP raggiunge un plateau elevato a circa 4-5 anni e rimane a questo livello sino a 20 anni(46,54). Cosa accada oltre i 20 anni di età rimane poco chiaro per carenza di dati. Circa il 46% dei tori di razza frisona selezionati per parametri positivi sia genetici sia riproduttivi in centri di inseminazione artificiale vengono scartati per

problemi riproduttivi(83) e sostituiti da tori geneticamente superiori. Pochi tori di qualsiasi razza vengono mantenuti oltre i 20 anni di età per ragioni genetiche. Il fatto che alcuni maschi mantengano la loro fertilità anche con l'avanzare dell'età è indicato dalla fertilità in tori di 19 anni di età(84) ed una paternità di un uomo di 94 anni(85). Diversi anni dopo viene pubblicato uno studio di Dowsett e Knott<sup>(19)</sup> che sottolineava la carenza di informazioni sull'effetto dei parametri razza ed età sul seme equino<sup>(20-24)</sup> rispetto ad altri fattori quali stagione dell'anno e frequenza di raccolta del materiale seminale<sup>(20,25-31)</sup>. Lo studio ha interessato 168 stalloni per un periodo di 4 anni. Le sole caratteristiche che non mostravano una variazione significativa dovuta all'età erano il colore del seme gel-free e il numero di pulsazioni per eiaculato. Le variazioni in termini di volume (totale, gel e gel-free) relative all'età erano dovute principalmente ai volumi ridotti ottenuti da puledri sotto i 3 anni di età. Gli animali in questo gruppo di età presentavano le concentrazioni minori e il numero totale di spermatozoi più basso così come le percentuali più alte di spermatozoi morti e non motili e spermatozoi con teste anomale, gocce citoplasmatiche prossimali e code anomale. I volumi totali e gel-free più alti sono stati ottenuti da stalloni appartenenti ai gruppi di 5, 9, 10 e 13 anni. C'era una tendenza generale per il volume del gel ad aumentare con l'età fino a 9-10 anni per poi declinare. Gli stalloni dei gruppi di 12-13 anni avevano le concentrazioni spermatiche più alte mentre il numero totale di spermatozoi più elevato si riscontrava negli stalloni

tra 5 e 13 anni. Vi era una tendenza generale per le percentuali di spermatozoi con anomalie della testa e della coda a diminuire con l'età dai 3 ai 9 anni dopo di che le anomalie della testa rimanevano relativamente costanti mentre le anomalie della coda tendevano ad aumentare. Questi risultati indicavano che la maggior parte delle caratteristiche del seme e degli spermatozoi sono influenzate dall'età dello stallone. Seme di scarsa qualità veniva recuperato da stalloni o sotto i 3 anni o sopra i 14. Questo riscontro è simile a quanto riportato da Pickett<sup>(23)</sup>. Gli effetti dell'età erano probabilmente dovuti a differenze nella produzione spermatica giornaliera e nel rilascio che, a loro volta, sono collegati a fattori come la spermatogenesi immatura nei puledri, la degenerazione testicolare dovuta all'invecchiamento e ad un'alterata funzione epididimale<sup>(24,33-36)</sup>. Mentre gli effetti dell'età sui parametri seminali sono evidenti, hanno una scarsa influenza sulla fertilità dello stallone eccetto nel caso di stalloni molto giovani o molto vecchi. Comunque si raccomanda di tener conto dell'età quando si valutano stalloni con finalità riproduttive<sup>(19)</sup>. Poiché la maturità sessuale nel cavallo si verifica a 5 anni di età<sup>(11)</sup> i piccoli volumi seminali, le concentrazioni spermatiche basse, il numero basso di spermatozoi totali, elevate percentuali di spermatozoi non motili e morti e le anomalie spermatiche dovrebbero essere considerati normali in stalloni sotto i 3 anni di età<sup>(19)</sup>. Questi dati indicano che stalloni giovani o non dovrebbero essere utilizzati per gli accoppiamenti o dovrebbero essere oggetto di un utilizzo più mirato, contrariamente alla gestione

routinaria di diverse stazioni di monta<sup>(19)</sup>. Ley<sup>(37)</sup> ha suggerito che gli stalloni di 3 anni dovrebbero essere utilizzati solo una volta al giorno una volta che sono state riscontrate normali la libido e le dimensioni testicolari. La ridotta qualità del seme di stalloni anziani (11 anni o più) potrebbe indicare l'esistenza di una età critica nella quale alcuni stalloni producono aumentati numeri di spermatozoi anomali per difettose spermatogenesi e funzione epididimale<sup>(19)</sup>. Questa ipotesi è sostenuta da Dowsett e Pattie<sup>(38)</sup> che riportano che un calo della fertilità può essere atteso in stalloni sopra i 10 anni di età. Comunque ci sono probabilmente stalloni di questa età che continuano a produrre spermatozoi normali. Alla luce di ciò si suggerisce che stalloni di 14 anni ed oltre stiano andando incontro alla conclusione della carriera riproduttiva e dovrebbero essere utilizzati solo in un sistema di controllo rigido della qualità del seme<sup>(19)</sup>. Mentre la maggior parte dei gruppi di età presentavano un numero medio di tentativi di monta per raccolta che era simile a quanto riportato da Asbury e Hughes<sup>(39)</sup>, Pickett<sup>(40)</sup>, Pickett e Voss<sup>(28)</sup> e Pickett e colleghi<sup>(4)</sup> i risultati di questo studio indicano che ci si potrebbe aspettare difficoltà con stalloni giovani inesperti e con stalloni vecchi non abituati alla monta alla mano. Alcuni stalloni potrebbero rimanere sessualmente inesperti a 5-6 anni di età dopo le corse o altri usi come indicato da numeri di monte che sia loro sia soggetti di 1-2 anni richiedono per la raccolta di un campione di seme. Differenze di razza nel volume seminale sono state riportate da Nishikawa e Waide<sup>(22)</sup>, Bielansky<sup>(20)</sup>, Hendrikse<sup>(21)</sup> e Pickett<sup>(23)</sup>.

Nello studio di Dowsett e Knott<sup>(19)</sup> si riscontravano variazioni di razza nei volumi seminali totali e gel-free. Il significato di ciò dipende dal sistema di accoppiamento in quanto il volume è poco importante in sistemi di IA<sup>(4,32)</sup> ma è connesso con la fertilità in stalloni a monta naturale<sup>(38)</sup>. Pony Shetland, Australian Stock Horse, Quarter Horse e Angloarabi producevano più gel rispetto a stalloni di altre razze. Gli stalloni arabi producevano gel in minime quantità differendo dai riscontri di Pickett e Voss<sup>(28)</sup> che suggeriscono che gli stalloni arabi negli Stati Uniti producano più gel di altre razze. Non si ha una visione uniforme circa differenze di razza in termini di motilità spermatica<sup>(21,22,27)</sup>. Nonostante in questo studio<sup>(19)</sup> differenze di razza fossero evidenti per la motilità, la maggior parte delle razze rientrava nei limiti di tolleranza<sup>(25,28,40)</sup>. La motilità spermatica è considerata da molti essere un importante aspetto dell'esame seminale per cui la conoscenza delle differenze di razza può essere importante nella valutazione degli stalloni. Comunque Voss e colleghi<sup>(41)</sup> e Dowsett e Pattie<sup>(38)</sup> hanno mostrato che la percentuale di spermatozoi motili non era correlata con la fertilità. La percentuale degli spermatozoi morti ricadeva anch'essa nei limiti di accettabilità<sup>(42,43)</sup> per gli stalloni di tutte le razze tranne che per i pony Shetland. Giacché Dowsett e Pattie<sup>(38)</sup> trovarono che la percentuale di spermatozoi morti era significativamente correlata con le percentuali di gravidanza e la percentuale di cavalle gravide, bisognerebbe fare attenzione quando si utilizzano campioni



seminali con un numero elevato di spermatozoi morti<sup>(19)</sup>. Ciò potrebbe essere causato da fattori come lo stress da calore, lunghi periodi di riposo sessuale, problemi epididimali e impropria gestione del seme durante la valutazione<sup>(19)</sup>. Questi effetti potrebbero essere temporanei o permanenti per cui sarebbe meglio effettuare altri due prelievi per valutare appieno la gravità del problema<sup>(19)</sup>. Le differenze di razza osservate nelle concentrazioni spermatiche e nel numero di spermatozoi totali in questo studio<sup>(19)</sup> supportano i riscontri di Nishikawa e Waide<sup>(22)</sup>, Bielanski<sup>(20)</sup>, Hendrikse<sup>(21)</sup> e Pickett<sup>(23)</sup>. Comunque è improbabile che queste differenze possano avere un effetto sulla fertilità degli stalloni (ad eccezione dei ponies) giacché il numero di spermatozoi totali era ben superiore rispetto al numero minimo di  $2 \times 10^9$  e  $1.3 \times 10^9$  suggeriti essere necessari per garantire una fertilità normale in contesti di monta naturale<sup>(38,44)</sup>. È probabile che il basso numero di spermatozoi totali negli stalloni pony fosse dovuto ad un volume di seme più basso in quanto la concentrazione spermatica era abbastanza soddisfacente<sup>(19)</sup>. Differenze di razza nella morfologia spermatica erano state precedentemente riportate da Pickett<sup>(23)</sup>. Questo studio ha anche mostrato una significativa variazione nelle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi tra razze. Comunque le implicazioni biologiche di questi riscontri non sono così importanti vista la scarsa correlazione della morfologia degli spermatozoi di stallone con la fertilità<sup>(38,41)</sup>. Sebbene PSI, Angloarabo, Australian Stock Horse, Appaloosa e Quarter Horse richiedessero un numero maggiore di monte per

raccolta rispetto alla monta naturale (1.4 monte)<sup>(45)</sup> la maggior parte degli stalloni dello studio di Dowsett e Knott<sup>(19)</sup> eiaculavano rapidamente nella vagina. Gli stalloni di tutte le razze nello studio di Dowsett e Knott<sup>(19)</sup> erano nel range di 1.38-2.2 monte o al di sotto di quanto riportato da altri lavori<sup>(4,28,33,39,40)</sup> con vagina artificiale. I riscontri di questo studio indicano che possono essere attese differenze di razza nella qualità del seme e nel comportamento alla monta e che la maggior parte di queste variazioni dovrebbero essere considerate normali variazioni. Variazioni dovute alla razza, allo stallone all'interno della razza e tra campioni dello stesso stallone dovrebbero essere prese in considerazione quando si valuta il seme dello stallone.

### **3.3 NUMERO DEI PRELIEVI**

La frequenza di eiaculazione rappresenta uno dei più importanti fattori che influiscono sullo sperma eiaculato. All'aumentare delle eiaculazioni diminuisce il numero di spermatozoi per eiaculato laddove la frequenza di eiaculazione sia superiore ad una ogni due giorni<sup>(47)</sup>. In uno stallone con elevata libido la fertilità potrebbe dunque diminuire per un eccessivo utilizzo soprattutto all'inizio della stagione di monta quando la produzione spermatica è circa il 50% del picco stagionale<sup>(4,47)</sup>. Per studiare gli effetti della frequenza di eiaculazione su alcune caratteristiche seminali e comportamentali 9 stalloni Quarter Horse e PSI vennero assegnati in maniera casuale a tre gruppi<sup>(47)</sup>. Ai tre gruppi venne attribuita una frequenza di prelievi settimanali per 4 settimane di 1, 3 e 6

volte<sup>(47)</sup>. Alla fine di ogni periodo di prelievi gli stalloni venivano posti a riposo sessuale per una settimana e gli stalloni venivano riassegnati ad un altro programma di prelievi fino a che tutti gli stalloni non erano stati sottoposti ai 3 programmi di prelievo<sup>(47)</sup>. Le valutazioni si limitavano alle ultime due settimane di ogni esperimento così che la EGR fosse stabilizzata<sup>(47)</sup>. Non si verificavano differenze ( $P>0.05$ ) in termini di volume di gel, volume gel-free o volume seminale totale per eiaculato<sup>(47)</sup>. Il volume di gel per i tre gruppi (x1, x3, x6) era rispettivamente di 18,8 e 6 ml per eiaculato<sup>(47)</sup>. Il volume di gel, il volume gel-free ed il volume totale erano differenti tra stalloni ( $P<0.01$ )<sup>(47)</sup>. Sebbene l'effetto della frequenza di eiaculazione non fosse significativa più frequentemente venivano prelevati gli animali e minore era il volume di gel<sup>(47)</sup>. Un totale di 47, 56 e 51 ml di seme gel-free veniva raccolto a frequenze di 1, 3 e 6 volte la settimana rispettivamente e non venne notata alcuna differenza nel volume seminale legata alla frequenza di eiaculazione<sup>(47)</sup>. Quindi uno stallone può eiaculare grossi volumi di plasma seminale indipendentemente dalla concentrazione spermatica<sup>(47)</sup>. Ovviamente il numero di spermatozoi è più importante del volume per ottenere la massima fertilità<sup>(47)</sup>. I volumi totali per prelievo erano di 65 ml per 1x, 54 ml per 3x e 57ml per 6x<sup>(47)</sup>. Le differenze erano principalmente legate al volume di gel e non al seme gel-free<sup>(47)</sup>. La concentrazione spermatica era in media di 288 milioni, 248 milioni e 142 milioni per millilitro rispettivamente per 1x, 3x e 6x<sup>(47)</sup>. Nonostante la differenza

di due prelievi la settimana tra 1x e 3x la differenza in termini di spermatozoi per ml era di soli 40 milioni<sup>(47)</sup>. Sebbene la concentrazione spermatica era simile quando uno stallone veniva prelevato una volta la settimana o a giorni alterni, quando veniva prelevato 6 volte la settimana la concentrazione media era solo il 50% del numero ottenuto con le frequenze 1x e 3x<sup>(47)</sup>. Gli stalloni presentavano in media 11.4 miliardi di spermatozoi per eiaculato a 1x, 11.7 miliardi a 3x ma solo 5.9 miliardi a 6x ( $P < 0.05$ )<sup>(47)</sup>. Dunque uno stallone prelevato a giorni alterni eiacula tanti spermatozoi per volta come se venisse prelevato una o meno volte la settimana<sup>(47)</sup>. La produzione spermatica totale per settimana era di 11.4 miliardi di spermatozoi, 35.2 e 35.3 miliardi alle frequenze ricordate di 1x, 3x e 6x<sup>(47)</sup>. Quando EGR diviene stabile la produzione spermatica settimanale è identica tra 3x e 6x<sup>(47)</sup>. Ciò indica che aumentare la frequenza sopra le 3 volte la settimana non determina un aumento del numero di spermatozoi per settimana e per prelievo<sup>(47)</sup>. La percentuale degli spermatozoi motili progressivi era del 54%, 52% e 56% per i tre gruppi di frequenze<sup>(47)</sup>. Quindi le frequenze di prelievo non avevano un effetto deleterio sulla qualità spermatica sulla base della motilità<sup>(47)</sup>. Il tempo di reazione e il numero di monte per eiaculato non erano influenzati dalle frequenze di prelievo<sup>(47)</sup>. In un altro esperimento<sup>(47)</sup> 9 stalloni maturi di razza PSA, Connemara, Quarter Horse e Pony Welsh venivano assegnati in maniera casuale a delle frequenze di eiaculazione di due volte o quattro volte alla settimana per quattro settimane. Per la frequenza di eiaculazione più bassa

veniva raccolto un eiaculato al giorno il martedì e il venerdì di ogni settimana mentre per la frequenza più elevata venivano recuperati due eiaculati al giorno il martedì ed il venerdì di ogni settimana<sup>(47)</sup>. Lo studio consisteva di tre periodi di 4 settimane<sup>(47)</sup>. Dunque stalloni nel gruppo I venivano prelevati a frequenze di 2x, 4x e 2x per settimana per tre periodi di raccolta<sup>(47)</sup>. Nel frattempo gli stalloni del gruppo II venivano prelevati 4x, 2x e 4x<sup>(47)</sup>. L'aumento della frequenza eiaculatoria da una a due volte al giorno, due volte la settimana, aumentava ( $P<0.01$ ) il volume seminale ottenuto in un giorno<sup>(47)</sup>. Il volume dei secondi eiaculati raccolti lo stesso giorno dei primi eiaculati era minore ( $P<0.01$ ) rispetto ai primi eiaculati (58 vs. 49 ml)<sup>(47)</sup>. Venivano recuperati più spermatozoi con due eiaculati rispetto ad uno solo ma le concentrazioni medie di spermatozoi nei due eiaculati raccolti lo stesso giorno era inferiore ( $P<0.05$ ) rispetto ad un singolo eiaculato<sup>(47)</sup>. Questo era principalmente causato dalla minore concentrazione ( $P<0.01$ ) nei secondi eiaculati<sup>(47)</sup>. Come risultato del minore volume seminale e concentrazione spermatica il numero di spermatozoi nel secondo eiaculato era 45.8% inferiore ( $P<0.01$ ) rispetto ai primi eiaculati prelevati lo stesso giorno<sup>(47)</sup>. Tuttavia il numero di spermatozoi per settimana per la frequenza 4x era 25.4% più grande ( $P<0.01$ ) rispetto alla frequenza 2x<sup>(47)</sup>. La percentuale di spermatozoi motili nei primi e secondi eiaculati alla frequenza 4x tendeva ad essere più elevata della frequenza 2x (58 vs. 49%)<sup>(47)</sup>. Allo stesso tempo non si osservavano differenze ( $P<0.05$ ) nella percentuale di motilità tra primi e secondi eiaculati: la

produzione spermatica alle frequenze 3x e 6x era la stessa della frequenza 4x<sup>(47)</sup>. Quando venivano prelevati due campioni successivi lo stesso giorno il numero di spermatozoi nel secondo eiaculato diminuiva di circa il 50% (45.8%)<sup>(47)</sup>. Uno studio di Pickett e colleghi<sup>(48)</sup> del 1985 si è basato su 10 stalloni tra i 3 e i 23 anni di età con due gruppi di frequenze ad incrocio. Il seme veniva prelevato una o due volte al giorno<sup>(48)</sup>. Prima di iniziare l'esperimento gli stalloni venivano sottoposti a 1 prelievo giornaliero per 8 giorni<sup>(48)</sup>. Dopo gli 8 giorni di stabilizzazione 5 stalloni (gruppo 1) venivano sottoposti ad 1 prelievo giornaliero per 14 giorni mentre gli stalloni del gruppo 2 venivano prelevati 2 volte al giorno<sup>(48)</sup>. Alla fine del periodo di prelievo i due gruppi venivano invertiti<sup>(48)</sup>. Durante ogni periodo di prelievo i primi 6 giorni venivano considerati come ulteriore periodo di stabilizzazione mentre gli 8 giorni rimanenti venivano utilizzati per le finalità di ricerca<sup>(48)</sup>. I secondi eiaculati venivano prelevati a circa 8 ore dai primi<sup>(48)</sup>. Il numero totale di spermatozoi disponibili era inferiore ( $P < 0.001$ ) nelle frequenze 2x in quanto un certo numero di spermatozoi venivano persi con il gel o nella vagina artificiale<sup>(48)</sup>. Comunque gli spermatozoi eiaculati erano gli stessi (7.5 miliardi vs. 7.4 miliardi) per le due frequenze di eiaculazione quando le eiaculazioni venivano corrette per le perdite spermatiche<sup>(48)</sup>. La concentrazione degli spermatozoi per millilitro di seme gel-free era inferiore ( $P < 0.001$ ) per la frequenza 2x (59 milioni vs 134.4 milioni) a causa del più elevato volume seminale gel-free ( $P < 0.001$ )<sup>(48)</sup>. La più importante

osservazione in questo esperimento era la quasi identica produzione spermatica nei due gruppi (7.5 miliardi vs. 7.4 miliardi) al di là della frequenza di eiaculazione. Si deve concludere che aumentando la frequenza di eiaculazione da 1x a 2x al giorno non si verificava un aumento nella produzione spermatica. Gebauer e colleghi<sup>(49)</sup> hanno effettuato prelievi giornalieri durante la stagione di monta su 11 stalloni di età compresa tra 3 e 13 anni. Sulla base del numero di spermatozoi prelevati per eiaculato EGR risultava stabilizzata a partire dal 5°-7° giorno di prelievi giornalieri consecutivi<sup>(49)</sup>. Quindi la DSO media dalla 2° settimana di prelievi giornalieri dovrebbe rappresentare la vera DSO di uno stallone per quel particolare periodo dell'anno<sup>(49)</sup>. L'elevato numero di spermatozoi prelevati durante la prima settimana di prelievi giornalieri è stato attribuito all'accumulo nelle EGR durante la settimana di riposo sessuale<sup>(49)</sup>. Quindi per ottenere l'attuale DSO per un particolare momento dell'anno il seme deve essere raccolto da stalloni giornalmente per circa una settimana prima di raccogliere i dati<sup>(49)</sup>. Dopo che l'EGR è stata stabilizzata l'accuratezza della stima del DSO dipende dal numero di giorni consecutivi che viene effettuato il prelievo<sup>(49)</sup>. Il numero di spermatozoi ottenuti al settimo giorno di prelievi giornalieri dovrebbe avvicinarsi al reale DSO<sup>(49)</sup>. Thompson e colleghi<sup>(50)</sup> hanno ulteriormente esaminato la precisione nel determinare il DSO utilizzando il modello a singolo prelievo giornaliero per 10 giorni. C'era un declino iniziale (1.54 miliardi per giorno) fino a un punto di cambiamento di 4.7 giorni

significando che sono richiesti circa 5 giorni per stabilizzare la produzione spermatica<sup>(50)</sup>. La dimensione testicolare influiva per un 36.5% sulla variazione interna allo stallone nel DSO<sup>(50)</sup>. Magistrini e colleghi<sup>(51)</sup> hanno valutato se la frequenza di eiaculazione influiva sulla qualità e congelabilità degli spermatozoi equini. Questi ricercatori hanno confrontato prelievi seminali con frequenza 3 e 5 volte per settimana<sup>(51)</sup>. Hanno valutato sia seme fresco che congelato/scongelato<sup>(51)</sup>. Hanno riportato che durante l'inverno gli eiaculati contenevano un volume inferiore di seme altamente concentrato e con una motilità leggermente inferiore<sup>(51)</sup>. La qualità del seme congelato non era influenzata dalla frequenza di eiaculazione<sup>(51)</sup>. Uno studio in Germania di Sieme e colleghi<sup>(52)</sup> ha interessato 71 stalloni e 6319 cavalle che erano state inseminate artificialmente entro 12 ore dal prelievo del seme. Lo studio era finalizzato alla valutazione della frequenza ed intervallo di prelievo del seme sulla vitalità e fertilità spermatica. Hanno dimostrato che gli eiaculati prelevati alla prima monta presentavano volumi minori e concentrazioni più elevate<sup>(52)</sup>. All'aumentare dei tentativi di monta si aveva una diminuita concentrazione spermatica<sup>(52)</sup>. La motilità totale e quella progressiva non erano influenzate dal numero di monte ma dopo 24 ore di stoccaggio quegli eiaculati raccolti dopo 3-6 monte presentavano una diminuita motilità progressiva<sup>(52)</sup>. Inoltre gli stalloni con una motilità progressiva superiore dopo 24 ore di stoccaggio avevano percentuali di gravidanza superiori<sup>(52)</sup>. Veniva affermato che la fertilità ottimale



si verificava quando la frequenza di prelievi era limitata a un singolo prelievo giornaliero per ogni stallone durante l'intera stagione riproduttiva<sup>(52)</sup>. Brinsko e colleghi<sup>(53)</sup> hanno valutato la qualità del seme di 10 stalloni che venivano prelevati, dopo almeno 7 giorni di riposo sessuale, a una frequenza di due eiaculati il primo giorno a distanza di un'ora e un terzo prelievo il giorno dopo. La motilità progressiva era maggiore (57%) nel terzo rispetto al primo eiaculato (51%)<sup>(53)</sup>. Questa sottile ma significativa differenza era probabilmente dovuta al lungo riposo sessuale e all'impossibilità di stabilizzare le riserve spermatiche<sup>(53)</sup>. Uno studio su 15 stalloni ha rivelato il numero di eiaculati giornalieri richiesti per rimuovere le riserve spermatiche extragonadiche per ottenere il DSO: tra 2 e 9<sup>(50)</sup>. L'esatta frequenza di eiaculazione che è necessaria per massimizzare il numero di spermatozoi per eiaculato e la qualità degli spermatozoi per eiaculato per la congelabilità del seme non è stata determinata. Sieme e colleghi<sup>(54)</sup> hanno confrontato la qualità del seme ottenuto da eiaculati prelevati 2 volte in un giorno, a distanza di un'ora ad intervalli di 48 ore rispetto a quelli prelevati una volta al giorno. Hanno concluso che il doppio prelievo a giorni alterni darebbe migliori risultati<sup>(54)</sup>.

### **3.4 DIMENSIONI TESTICOLARI**

La produzione spermatica giornaliera (DSP) rappresenta il numero di spermatozoi prodotti al giorno dai testicoli<sup>(3)</sup>. Il rilascio spermatico giornaliero (DSO) è invece il numero di spermatozoi eiaculati al giorno dopo che sono state

stabilizzate le riserve spermatiche extragonadiche<sup>(3)</sup>. L'efficienza della produzione spermatica è il numero di spermatozoi prodotti al giorno per grammo di tessuto testicolare<sup>(14)</sup>. Il numero di spermatozoi che un animale può produrre dipende strettamente dalla quantità di tessuto testicolare funzionale<sup>(3)</sup>. La dimensione testicolare è un fattore importante nel selezionare e gestire uno stallone per ottenere la massima efficienza riproduttiva una volta che si è appurato che la consistenza testicolare è adeguata<sup>(3)</sup>. Esistono due metodi di misurazione testicolare, calibro ed ecografia<sup>(3)</sup>. Una volta che i testicoli vengono spinti all'interno della sacca scrotale il calibro viene posizionato ai due lati dello scroto così da poter misurare il diametro trasverso dello scroto stesso<sup>(3)</sup>. Questo parametro prende il nome di "larghezza scrotale totale" (TSW)<sup>(3)</sup>. Per minimizzare l'errore sarebbe necessario effettuare la misurazione almeno tre volte<sup>(3)</sup>. In uno studio condotto nell'università del Colorado da Thompson e collaboratori<sup>(10)</sup> su 43 stalloni di linee da corsa e di età compresa tra 2 e 16 anni sono state misurate la TSW e la larghezza e lunghezza di ogni testicolo 5 volte al giorno per 6 giorni consecutivi da due operatori. Successivamente i soggetti sono stati sottoposti a castrazione e i testicoli pesati<sup>(10)</sup>. Si risaliva al peso del parenchima testicolare una volta rimossa la tunica albuginea<sup>(10)</sup>. La DSP veniva stabilita sulla base del peso del parenchima testicolare<sup>(18)</sup>. Al di là dell'età il TSW medio era di 102 mm<sup>(10)</sup>. Il più alto coefficiente di correlazione venne riscontrato tra larghezza scrotale e peso del parenchima. ( $r = 0.83$ )<sup>(10)</sup>. Ciò

significa che la TSW influiva per un 69% sul peso dei due testicoli<sup>(10)</sup>. Inoltre la TSW influiva per un 55% sulla DSP<sup>(10)</sup>. Le valutazioni della larghezza e lunghezza dei singoli testicoli non fornivano correlazioni migliori rispetto alla TSW<sup>(10)</sup>. Gli autori concludevano dunque che TSW è il parametro di maggior interesse nel predire la DSP nei soggetti integri. In altre specie la dimensione testicolare è altamente ereditabile<sup>(15)</sup>. Una minore correlazione veniva riscontrata nel caso della DSO che comunque può essere stimata con un certo grado di correttezza laddove vengano effettuati prelievi giornalieri per una settimana o a giorni alterni per due settimane<sup>(3)</sup>. Love e colleghi<sup>(16)</sup> sono stati i primi a valutare il volume testicolare come mezzo per predire il DSO nello stallone. Questi studiosi hanno misurato larghezza, altezza e lunghezza di ogni testicolo ed hanno utilizzato la formula di un ellissoide per stabilire il volume testicolare di ogni testicolo. Le misurazioni ecografiche si sono rivelate molto più accurate per stabilire la DSO rispetto alle misurazioni col calibro<sup>(3)</sup>. La formula per stabilire il volume testicolare era:  $\text{Volume} = 4/3 \pi \times \text{larghezza}/2 \times \text{altezza}/2 \times \text{lunghezza}/2$  dove i valori di larghezza, altezza e lunghezza sono espressi in centimetri<sup>(16)</sup>. Associando i volumi testicolari destro e sinistro si ottiene il volume testicolare totale (TTV)<sup>(16)</sup>. Per predire la DSO venne creata una formula:  $\text{DSO} (10^9) = 0.024 (\text{TTV}) - 1.26^{(16)}$ . I valori ottenuti erano altamente correlati sia con il peso testicolare ( $r = 0.92$ ) sia con DSO ( $r = 0.91$ )<sup>(16)</sup>. Questa correlazione di DSO con il volume testicolare totale è chiaramente superiore rispetto a quella ottenuta con

TSW<sup>(16)</sup>. Un piccolo studio<sup>(17)</sup> è stato effettuato per confrontare il DSO di uno stallone con testicoli grossi (137mm) e uno stallone con testicoli ridotti (79mm). Il seme venne prelevato con una frequenza di 6 volte alla settimana per un mese<sup>(17)</sup>. La produzione spermatica del primo stallone nei primi 6 giorni era di 20.7 miliardi per eiaculato e, nel mentre, le riserve extragonadiche venivano stabilizzate<sup>(17)</sup>. Durante le successive 3 settimane le medie settimanali erano di 12.9, 12.0 e 11.7 con una DSO approssimativamente di 12 miliardi<sup>(17)</sup>. L'altro stallone eiaculava 5.9 miliardi di media la prima settimana per poi calare sino ad una DSO di 1.8 miliardi nel corso della quarta settimana<sup>(17)</sup>. Diversi studi sono stati condotti per determinare la relazione tra età dello stallone e misurazioni testicolari<sup>(10)</sup>. Sono stati utilizzati 48 stalloni di linea da corsa, di età compresa tra 2 e 16 anni<sup>(10)</sup>. L'età dei soggetti influenzava significativamente le dimensioni testicolari ed i testicoli di stalloni oltre i 7 anni di età erano maggiori rispetto a quelli di stalloni più giovani<sup>(10)</sup>. La TSW media per stalloni di 2-3, 4-6 e 7 anni e oltre era rispettivamente di 96, 100 e 109 mm<sup>(10)</sup>. Il coefficiente di correlazione tra TSW ed età era di 0.64 ( $P < 0.01$ )<sup>(10)</sup>. Circa il 40% della variazione della dimensione testicolare può essere attribuito all'età e, sebbene la larghezza scrotale fosse positivamente correlata con il peso corporeo, quando il peso corporeo e l'età venivano considerate assieme solo l'età giustificava una notevole variazione<sup>(10)</sup>. Quindi, per una data età, la larghezza scrotale era indipendente dal peso corporeo<sup>(10)</sup>. In un altro studio per determinare l'influenza

dell'età sulle caratteristiche seminali vennero effettuati 5 eiaculati consecutivi<sup>(12)</sup>. Vennero utilizzati due gruppi di stalloni clinicamente normali di linee da corsa tra i 2 e i 16 anni di età<sup>(12)</sup>. I valori di alcune caratteristiche declinavano in maniera marcata con il succedersi degli eiaculati<sup>(12)</sup>. Gli stalloni dei gruppi 4-6 e 9-16 anni producevano una maggiore quantità di seme gel-free e un più elevato volume totale rispetto agli stalloni di 2-3 anni di età<sup>(12)</sup>. La quantità di gel negli eiaculati degli stalloni più anziani (13ml) appariva essere maggiore rispetto agli stalloni giovani (2ml) sebbene la differenza non fosse significativa<sup>(12)</sup>. Il numero di spermatozoi per ml era simile per tutti e tre i gruppi (120 milioni, 161 milioni e 161 milioni rispettivamente)<sup>(12)</sup>. Un numero inferiore di spermatozoi venivano recuperati da eiaculati di stalloni di 2-3 anni di età rispetto a soggetti di 9-16 anni<sup>(12)</sup>. Sebbene non vi fosse una differenza significativa, negli eiaculati medi di stalloni di 4-6 anni (3.6 miliardi) venne ottenuto un numero doppio di spermatozoi rispetto ai soggetti di 2-3 anni (1.8 miliardi)<sup>(12)</sup>. Il numero di spermatozoi per eiaculato era invece simile per soggetti di 4-6 anni e di 9-16 anni di età<sup>(12)</sup>. Ciò evidenzia quanto uno stallone non diventi sessualmente maturo prima dei 6 anni di età<sup>(12)</sup>. La qualità del materiale seminale era simile per tutti i gruppi come evidenziato da medie del 55%, 63% e 60% di spermatozoi motili progressivi per stalloni di 2-3, 4-6 e 9-16 anni rispettivamente<sup>(12)</sup>. L'influenza dell'età si rendeva ancor più evidente nei successivi eiaculati a distanza di un'ora<sup>(12)</sup>. Le principali differenze nella

eiaculazione degli spermatozoi erano evidenti tra stalloni di 2-3 anni e quelli degli altri due gruppi ma non tra stalloni di 4-6 anni e 9-16<sup>(12)</sup>. Il numero di spermatozoi per eiaculato era inferiore ( $P < 0.05$ ) per gli stalloni di 2-3 anni rispetto a quelli di 9-16 nel primo e secondo eiaculato ma non nei successivi<sup>(12)</sup>. Il primo eiaculato da stalloni di 4-6 anni conteneva più spermatozoi rispetto all'eiaculato proveniente da soggetti di 2-3 anni ( $P < 0.05$ ) ma leggermente meno rispetto a quelli di 9-16<sup>(12)</sup>. Il numero totale di spermatozoi per eiaculato diminuiva con ogni eiaculato successivo per gli stalloni di 2-3 anni di età ma questa diminuzione non era significativa<sup>(12)</sup>. Il numero di spermatozoi ottenuti in 5 eiaculati da soggetti di 2-3 anni (8.9 miliardi) era inferiore ( $P < 0.05$ ) rispetto ai 22.3 miliardi ottenuti da stalloni di 9-16 anni<sup>(12)</sup>. Gli spermatozoi ottenuti da stalloni di 4-6 anni nei 5 eiaculati presentavano una media di 18 miliardi<sup>(12)</sup>. Dal 5° eiaculato quasi la metà degli eiaculati dei soggetti più giovani contenevano meno di 200 milioni di spermatozoi<sup>(12)</sup>. Quindi i soggetti di 2-3 anni non possono essere utilizzati con la stessa frequenza dei soggetti più anziani<sup>(12)</sup>. Al contrario stalloni di 4-6 anni e 9-16 contenevano più di 200 milioni di spermatozoi<sup>(12)</sup>. Jones e Berndtson<sup>(18)</sup> hanno ottenuto testicoli da 47 stalloni mediante castrazione o da mattatoio. Gli stalloni avevano età compresa tra 2 e 20 anni e gli autori affermavano che i testicoli aumentavano di dimensioni sino a circa 12 anni di età<sup>(12)</sup>. Il numero delle cellule del Sertoli diminuiva in maniera

lineare dai 2 ai 20 anni di età pur accomodando un numero superiore di cellule spermatiche<sup>(12)</sup>.

### **3.5 RAZZA**

Nello studio di Dowsett e Knott<sup>(19)</sup> del 1996, precedentemente riportato, si riscontrava una variabilità di razza significativa per tutte le caratteristiche eccetto il pH e il punteggio del colore del seme gel-free, la percentuale di anomalie del pezzo intermedio e il numero di pulsazioni uretrali. Tutte le caratteristiche eccetto il pH erano affette da una variazione significativa tra stalloni all'interno delle stesse razze<sup>(19)</sup>. Pony, palomino ed appaloosa nello studio in corso producevano volumi di seme totali minori rispetto ad altre razze<sup>(19)</sup>. I volumi di seme gel-free minori venivano prodotti dai pony e solo leggermente maggiori erano quelli di stalloni di razza appaloosa, palomino e quarter horse<sup>(19)</sup>. I volumi di gel più ridotti venivano prodotti da stalloni palomino e arabi<sup>(19)</sup>. Le concentrazioni spermatiche e il numero spermatico totale di stalloni arabi erano notevolmente più alti rispetto a quelli di altre razze<sup>(19)</sup>. Le concentrazioni spermatiche più basse si ottenevano da angloarabi ed appaloosa mentre pony e Shetland pony producevano eiaculati che contenevano il numero totale di spermatozoi più basso<sup>(19)</sup>. Gli stalloni arabi avevano la percentuale di cellule spermatiche morte più basse mentre i pony Shetland le più

elevate<sup>(19)</sup>. Il numero minore di monte richieste per raccogliere campioni di seme soddisfacenti provenivano da pony Shetland e arabi mentre i PSI richiedevano il maggior numero di monte per raccolta<sup>(19)</sup>.

### **3.6 FERTILI/IPOFERTILI**

Gli stalloni vengono selezionati prima di tutto sulla base della genealogia, morfologia, andature e performance sportive<sup>(106)</sup>. Inoltre diversi studbook escludono stalloni che non sono conformi con certi standard di razza o che sono affetti da anomalie ereditabili o sospette tali. La fertilità non rappresenta un criterio di selezione primario ma la maggior parte dei registri di razza richiedono una certificazione di “adeguato potenziale riproduttivo” basato su riscontri della fertilità al momento dell’esame o sulla valutazione riproduttiva (BSE)<sup>(58)</sup>. In Nord America le linee guida sull’esame dell’apparato riproduttore da parte della Society for Theriogenology sono state sviluppate con l’obiettivo di selezionare stalloni che potessero ingravidare almeno il 75% di 40 o più cavalle in un sistema di monta naturale o 120 cavalle in un sistema di inseminazione artificiale<sup>(110)</sup>. In accordo con queste linee guida uno stallone potenzialmente soddisfacente dovrebbe produrre un minimo di un miliardo di spermatozoi motili e progressivi, morfologicamente normali, in ognuno di due eiaculati raccolti a un’ora di distanza l’uno dall’altro. Non veniva tuttavia indicata la



percentuale assoluta di spermatozoi anomali o percentuale di specifici difetti nell'eiaculato<sup>(110)</sup>. Inoltre il numero di spermatozoi non sempre è proporzionale alla percentuale di gravidanza<sup>(107)</sup> in quanto spermatozoi competenti potrebbero competere con spermatozoi privi di difetti morfologicamente evidenti ma incapaci di sostenere lo sviluppo embrionale normale<sup>(107)</sup>. Quindi in alcuni stalloni le percentuali di gravidanza non possono essere aumentate aumentando il numero degli spermatozoi nella dose<sup>(107)</sup>. Le osservazioni da studi sui tori suggeriscono che alterazioni nella spermatogenesi si estendono anche a spermatozoi dello stesso eiaculato morfologicamente normali ma questi spermatozoi, che possono farsi strada e fertilizzare l'oocita, sono in grado di causare morte embrionale<sup>(108,109)</sup>. Uno studio di Pickett e collaboratori<sup>(55)</sup> del 1987 ha presentato i risultati della valutazione della potenziale fertilità su 1044 stalloni. La maggior parte dei dati derivava da due eiaculati prelevati lo stesso giorno a distanza di circa un'ora e gli stalloni approvati dovevano presentare almeno un eiaculato sufficiente. Questi studiosi dividevano gli stalloni tra quelli che avevano superato l'esame per divenire stalloni e quelli che non lo avevano superato. Non veniva valutata la reale fertilità dei soggetti<sup>(55)</sup>. Il numero di stalloni approvati sulla base delle caratteristiche seminali variava tra 417 e 664 mentre gli altri erano 260-373<sup>(55)</sup>. In diverse valutazioni il primo eiaculato era molto buono ed il secondo scadente o viceversa<sup>(55)</sup>. Di conseguenza i veterinari facevano superare l'esame a soggetti che presentavano un eiaculato

estremamente scadente. Ciò inficiava le caratteristiche seminali del gruppo degli stalloni approvati<sup>(55)</sup>. Gli stalloni che superavano la prova avevano volumi di seme gel-free maggiori nei due eiaculati rispetto ai soggetti scartati (45 vs 40 e 42 vs 38)<sup>(55)</sup>. Comunque le differenze in termini di volume totale erano minime<sup>(55)</sup>. Il volume è considerato poco importante rispetto alla concentrazione spermatica ed al numero di spermatozoi totali<sup>(55)</sup>. Il numero di spermatozoi nel secondo eiaculato di stalloni a riposo sessuale dovrebbe essere circa il 50% del primo<sup>(4)</sup>. La percentuale nello studio di Pickett era 47.1% per gli stalloni che superavano la visita rispetto al 50% per quelli che non passavano<sup>(55)</sup>. La percentuale degli spermatozoi motili nel primo e secondo eiaculato di stalloni approvati era di 53% e 57% rispettivamente rispetto al 30 e 34% di quelli non approvati<sup>(55)</sup>. Come atteso, i secondi eiaculati presentavano percentuali superiori e il numero degli spermatozoi morfologicamente normali negli stalloni che superavano la prova era di 51 e 57% rispetto al 35 e 38% di quelli che non passavano<sup>(55)</sup>. Love<sup>(56)</sup> afferma che almeno 5-10 campioni dovrebbero essere valutati per determinare un valore attendibile. La valutazione singola o su due campioni era molto limitante<sup>(56)</sup>. Se i campioni sono sufficienti invece la morfologia è attendibile nel predire la fertilità<sup>(56)</sup>. Il pH dei secondi eiaculati era più alto rispetto ai primi e questo lo si attribuiva alla presenza del solo 50% degli spermatozoi nel secondo eiaculato accompagnati da un minore fluido epididimale<sup>(56)</sup>. Gli stalloni che superavano la selezione avevano una larghezza

scrotale totale di 108 mm rispetto ai 98 di quelli che non superavano la prova<sup>(56)</sup>. Love<sup>(56)</sup> ha fatto riferimento all'uso del calibro e dell'ecografia per misurare correttamente le dimensioni testicolari. Nello studio sono stati considerati soggetti di 19 razze ma solo Appaloosa, Paint Horse, PSA, Quarter Horse e PSI erano presenti in numero sufficiente per garantire una presentazione per razza<sup>(56)</sup>. Gli stalloni PSI producevano nel primo eiaculato più spermatozoi rispetto ai Paint Horse (13 vs 8.5 miliardi)<sup>(56)</sup>. Il numero di spermatozoi era coerente con la larghezza scrotale totale che era di 111 mm per i PSI e 102 per i Paint Horse<sup>(56)</sup>. Tra gli stalloni che non superavano la prova i PSI eiaculavano 11.1 miliardi e 5.2 miliardi nei due eiaculati mentre gli stalloni Appaloosa 7.2 e 2.5 miliardi. Inoltre la larghezza scrotale era maggiore nei PSI<sup>(56)</sup>. Dowsett e Pattie<sup>(38)</sup> hanno raccolto dati da 4 stagioni di monta consecutive confrontando le caratteristiche riproduttive di 63 stalloni con parametri nella norma e 10 stalloni con scadente fertilità. Il volume totale, il volume gel-free, il volume del gel, la concentrazione, il numero di spermatozoi, la motilità e il numero totale di spermatozoi vivi per eiaculato presentavano valori inferiori nel gruppo degli stalloni che non avevano superato la prova<sup>(38)</sup>. In uno studio successivo Dowsett e Knott<sup>(19)</sup> hanno ottenuto dati da 4 stagioni di monta consecutive su 22 stalloni di 13 diverse razze e sono stati inclusi 648 prelievi. Nello studio è stato introdotto un parametro, “densità ed attività di massa”, per la cui valutazione immediatamente dopo il prelievo una goccia di seme gel-free veniva posta su un

vetrino riscaldato<sup>(19)</sup>. La densità veniva valutata visivamente per stimare la concentrazione spermatica e punteggiata da 0 a 3<sup>(19)</sup>. L'attività di massa era un valore visivo dell'attività generale di una popolazione spermatica ed il punteggio variava tra 0 e 3 (dove 0 rappresentava l'azoospermia o la necrospermia; 1 indicava motilità <30% e/o < 50 milioni /ml; 2 30-70% di motilità e/o 50-150 milioni/ml; 3 >70% motilità e/o >150 milioni/ml)<sup>(19)</sup>. Il punteggio medio dell'attività di massa era 2.07 ed il punteggio della densità era 2.03<sup>(19)</sup>. La concentrazione spermatica era in media di 164 milioni e gli spermatozoi totali 6.34 miliardi<sup>(19)</sup>. In questo studio l'anomalia morfologica maggiormente presente era associata con il pezzo intermedio (12.9%)<sup>(19)</sup>. In questo studio pony, appaloosa e palomino producevano meno spermatozoi ed un volume seminale totale minore rispetto alle altre razze<sup>(19)</sup>. La concentrazione spermatica ed il numero di spermatozoi totali degli stalloni arabi erano notevolmente più alti rispetto alle altre razze<sup>(19)</sup>. La concentrazione spermatica più bassa si riscontrava in angloarabi ed appaloosa<sup>(19)</sup>. Gli stalloni arabi avevano la percentuale più bassa di spermatozoi morti mentre i pony Shetland la più elevata<sup>(19)</sup>. Jasko<sup>(57)</sup> ha presentato una review sulla valutazione del seme di stallone. Comunque poiché i comuni parametri della qualità seminale si correlano solo moderatamente con la fertilità in campo l'obiettivo della valutazione riproduttiva (BSE) è solo quello di escludere stalloni ovviamente incapaci di un'adeguata fertilità<sup>(58)</sup>. In Olanda KWPN, KFPS e KVTH richiedono che gli stalloni superino un esame da

effettuare in laboratori riconosciuti. Inoltre ogni studbook utilizza criteri diversi per la valutazione della qualità del seme in quanto si tiene conto delle significative differenze di razza da porre in relazione con la dimensione corporea, età/maturità e grado di inbreeding. Inoltre le probabili richieste di seme variano notevolmente tra razze. In stalloni PSI gestiti in maniera intensa si evidenziano grosse differenze in termini di fertilità. Morris e Allen<sup>(59)</sup> hanno riportato percentuali di gravidanza per ciclo a fine stagione tra il 37% e 90% e tra 69% e 100% rispettivamente. In uno studio su 107 stalloni Hannover utilizzati per inseminare 12.000 fattrici su circa 110.000 cicli le percentuali di gravidanza medie per ciclo variavano tra 31.9% e 46.7% con uno stallone che raggiungeva una percentuale del 9.8%<sup>(3)</sup>. Queste basse percentuali di gravidanza riflettono presumibilmente una meno corretta gestione sul campo visto che uno studio di Sieme e colleghi<sup>(60)</sup> ha riportato percentuali di gravidanza inferiori sul campo (39.1%) rispetto a quanto visto su soggetti inseminati nel centro di riferimento (53.9%). In Olanda vengono registrati solo stalloni con “adeguata qualità seminale” e viene regolamentato il numero di spermatozoi per dose inseminante. Inoltre le percentuali di parti all’anno su un numero minimo di 10 cavalle sono state riportate essere tra 36% e 83% per le razze sella<sup>(61)</sup> e tra 31% e 100% per i frisoni<sup>(62)</sup>. In alcuni studi<sup>(61,63)</sup> è stato utilizzato il parametro “mancato ritorno in calore” e, sulla base di questo, è stato riportato un range tra 27% e 89% per ciclo nei KWPN e tra 48% e 83% per i frisoni. Viene

generalmente accettato che, al posto dei dati sulla fertilità, si effettui una combinazione di esame clinico completo e valutazione convenzionale del materiale seminale così da provvedere una indicazione utile della fertilità potenziale<sup>(64)</sup>. L'esame completo valuta diversi aspetti della potenziale fertilità tra cui la libido, la capacità di accoppiamento, le dimensioni testicolari, la produzione spermatica e la qualità del seme<sup>(65)</sup>. Sebbene la produzione spermatica non si correla strettamente con dati oggettivi sulla fertilità<sup>(61)</sup> tuttavia fornisce una chiara indicazione sul numero di cavalle che possono essere coperte da un determinato stallone. La BSE è in sostanza utile per identificare stalloni di scarsa fertilità ma non è in grado di predire il giusto livello di fertilità. Jasko e collaboratori<sup>(66)</sup> hanno riscontrato una scarsa correlazione tra la fertilità in campo e le percentuali di spermatozoi motili, motili progressivi e morfologicamente normali (0.40, 0.46 e 0.36 rispettivamente). Gli autori sottolineavano che tra le varie razze la proporzione di stalloni classificati come futuri riproduttori non soddisfacenti differiva marcatamente. Quando la soglia della qualità del seme per le linee da salto olandesi era 50% di spermatozoi motili, 50% spermatozoi morfologicamente normali e 2 miliardi di spermatozoi totali motili morfologicamente normali (TNM) (media tra 2 eiaculati), solo l'8% degli stalloni non superava la prova<sup>(67)</sup>. Per gli stalloni frisoni e da tiro il valore di riferimento è 600 milioni di TNM (sempre media di due eiaculati). Sebbene vengano concessi 3 tentativi diversi nel corso dell'anno per raggiungere i criteri

minimi, il 30-40% degli stalloni frisoni ed il 14% dei cavalli da tiro non raggiungono l'obiettivo. Uno studio di Gamboa e colleghi<sup>(46)</sup> del 2009 ha analizzato le caratteristiche seminali di 9 stalloni in Portogallo durante il corso dell'anno. Gli stalloni sono stati sottoposti ad almeno 2 prelievi settimanali<sup>(46)</sup>. Nello studio gli stalloni sono stati divisi sulla base della fertilità evidenziata in maniera retrospettiva sulle annate precedenti: stalloni con alta fertilità alla fine della stagione (81.97%-89.79%) e stalloni con bassa fertilità (0-66.67%)<sup>(46)</sup>. È stato dimostrato che la qualità del seme negli stalloni mostra variazioni in relazione alla stagione<sup>(51,68)</sup> nonostante alcuni risultati contrastanti ottenuti da diversi ricercatori<sup>(6,69,70)</sup>. Nello studio di Gamboa e colleghi<sup>(46)</sup> si sono viste differenze stagionali significative per quanto concerne la concentrazione spermatica, la motilità, la vitalità, la morfologia spermatica e l'integrità acrosomiale. Riguardo la motilità spermatica, la morfologia e l'integrità acrosomiale lo studio non ha mostrato differenze significative nel seme raccolto da settembre a marzo<sup>(46)</sup>. D'altro canto gli eiaculati ottenuti durante l'inverno differivano significativamente da quelli ottenuti all'inizio della stagione riproduttiva (gennaio-metà marzo) per i parametri vitalità spermatica, potenziale di membrana mitocondriale e stabilità di membrana<sup>(46)</sup>. Un basso numero di spermatozoi per ml e la più bassa percentuale di spermatozoi motili progressivi è stata registrata nel periodo maggio-luglio<sup>(46)</sup>. Questi dati contrastano con i risultati di Magistrini e colleghi<sup>(51)</sup> e Hoffmann e Landeck<sup>(71)</sup> ma è in accordo

con Janett et al.<sup>(69)</sup> eccetto per le caratteristiche morfologiche spermatiche. Nel lavoro prelievi ripetuti sugli stessi animali evidenziavano variazioni intra ed inter-individuali<sup>(69)</sup>. Tali variazioni dei parametri seminali sono state riportate da alcuni autori in diverse specie<sup>(72,73)</sup> tra cui gli equini<sup>(74-76)</sup>. Sebbene non si possa escludere un possibile effetto della razza, in un precedente studio su soli stalloni purosangue lusitano<sup>(77)</sup> era evidente una variazione altamente significativa tra stalloni. Jasko et al.<sup>(78)</sup> e Love et al.<sup>(79)</sup> hanno trovato una relazione tra la percentuale di spermatozoi con difetti maggiori e la fertilità negli stalloni. Lo studio di Gamboa e colleghi<sup>(46)</sup> ha evidenziato che gli stalloni con problemi di fertilità presentavano una più alta percentuale di spermatozoi con membrane instabili e questa caratteristica era altamente correlata con le alterazioni morfologiche spermatiche. Inoltre i risultati in vivo mostravano che una migliore fertilità si otteneva da stalloni con una più elevata percentuale di cellule vive, con acrosoma integro con elevato potenziale di membrana mitocondriale<sup>(46)</sup>. Gli indici riproduttivi confermavano che gli stalloni con qualità del seme scadente avevano le percentuali di gravidanza peggiori<sup>(46)</sup>. In conclusione i parametri seminali monitorati sono influenzati principalmente dal periodo, poi dall'individuo ed infine dalla fertilità sottolineando l'importanza delle variazioni individuali<sup>(46)</sup>. Uno studio successivo di Gamboa e collaboratori<sup>(77)</sup> ha posto l'accento sulle valutazioni su stalloni Lusitano dove i soggetti maschi erano oggetto di un singolo prelievo del seme per valutarne la



qualità. L'età minima richiesta era di 3 anni ma potevano essere valutati anche stalloni più anziani<sup>(77)</sup>. Nonostante la mancanza di un chiaro effetto età l'analisi dei dati evidenziava una relazione positiva tra motilità spermatica e vitalità così come tra motilità e morfologia come già descritto da altri<sup>(81)</sup>. Dai dati ottenuti si poteva affermare che un singolo eiaculato non era sufficiente per valutare la qualità spermatica specialmente se ci si basava sulla motilità spermatica e la morfologia come visto da Pattie e Dowsett<sup>(82)</sup>. Le alterazioni morfologiche principali negli spermatozoi Lusitani erano a carico del pezzo intermedio<sup>(77)</sup>. Al contrario nei Sorraia si riscontravano nella regione della testa in concomitanza con un'abnorme dimensione<sup>(77)</sup>. Le correlazioni tra morfologia spermatica e fertilità non sono chiare e si hanno pareri contrastanti. Bielanski e Kaczmariski<sup>(83)</sup> ipotizzavano che >10% di alterazioni morfologiche primarie erano sempre espressione di una fertilità scadente mentre >30% di anomalie secondarie non era un dato associato necessariamente con la fertilità. Un recente studio di Najjar e colleghi<sup>(84)</sup> del 2010 ha evidenziato concentrazioni e numero totale degli spermatozoi superiori nei cavalli sotto i 15 anni di età rispetto agli anziani. Inoltre risultavano superiori negli anziani anche le percentuali degli spermatozoi morti e dei motili<sup>(84)</sup>. Lo studio si basava su un totale di 9 soggetti arabi, 5 al di sotto dei 15 anni di età e 4 al di sopra dei 15 anni<sup>(84)</sup>. Un precedente studio di Tibary<sup>(85)</sup> su stalloni arabi evidenzia che questi possono avere una concentrazione degli spermatozoi per ml variabile tra 149,9±100 e 286,8±86 x

106 mentre Jasko<sup>(66)</sup> ha riscontrato in un altro lavoro che la concentrazione variava tra  $173 \pm 118$  e  $335 \pm 232 \times 10^6$ . Comunque in uno studio di Chevalier-Clément e colleghi<sup>(86)</sup> su stalloni ipofertili sono stati definiti come fertili gli stalloni con una concentrazione spermatica minima di  $194 \pm 106 \times 10^6$  spermatozoi/ml riportando anche che gli stalloni ipofertili presentavano concentrazioni più basse ( $93 \pm 130 \times 10^6$ ) nonché percentuali inferiori di spermatozoi motili. Clement e colleghi<sup>(87)</sup> e Brito<sup>(88)</sup> hanno evidenziato che in presenza di un elevato numero di anomalie spermatiche si poneva il sospetto di ipofertilità. Posor<sup>(89)</sup> ha sottolineato che un elevato numero di spermatozoi anomali si accompagna ad anomalie del tratto riproduttivo come ad esempio il varicocele. Jasko<sup>(90)</sup> ha riferito su una stretta correlazione tra percentuali di gravidanza per ciclo e difetti della testa degli spermatozoi. Love e collaboratori hanno riscontrato che un 1% nella percentuale delle anomalie della testa si riflette in un calo dello 0,67% nelle percentuali di gravidanza per ciclo. Altri autori<sup>(91,92)</sup> hanno riportato che la percentuale delle teste distaccate dovrebbe essere nei soggetti fertili inferiore al 5%. Card<sup>(93)</sup> ha enfatizzato il concetto per cui se ci sono molte teste staccate si è di fronte ad anomalie della spermatogenesi o senescenza del tratto riproduttivo. Secondo Pesch e colleghi<sup>(94)</sup> le gocce citoplasmatiche venivano correlate negativamente con le percentuali di gravidanza, lavoro supportato da Jasko<sup>(90)</sup> con riferimento alle gocce citoplasmatiche prossimali e la fertilità mentre Love e collaboratori<sup>(95)</sup> non

riscontravano tale relazione tra le gocce citoplasmatiche prossimali e la fertilità. Uno studio retrospettivo di Akourki e collaboratori<sup>(96)</sup> del 2013 si è basato su dati raccolti tra il 2007 e il 2009 su 11 stalloni tra i 3 e i 14 anni di età. Gli stalloni sono stati divisi in due gruppi sulla base dell'età: un gruppo comprendeva stalloni tra 3 e 5 anni di età e un altro tra gli 8 e i 14 anni<sup>(96)</sup>. Diversi studi hanno tentato di mostrare la stagionalità del cavallo su un periodo di diversi anni<sup>(6,8,68,69,80,97,98)</sup>. Nel lavoro di Akourki et al.<sup>(96)</sup> sono stati raccolti eiaculati con i volumi più elevati in primavera ed estate, con la concentrazione più elevata in autunno ed inverno ma con una motilità spermatica simile nel corso di tutto l'anno. Questi risultati erano coerenti con quelli ottenuti da Janett et al.<sup>(69)</sup> in cavalli da salto in cui sono stati ottenuti volumi di eiaculato maggiori con concentrazioni di spermatozoi inferiori ma con una qualità spermatica migliore in estate. D'altronde lo studio concordava con Gamboa e colleghi<sup>(80)</sup> che lavorando su razze lusitano, Sorraia, sella francese, anglo-arabo e Garrano affermavano che gli eiaculati dell'autunno erano molto più concentrati rispetto a quelli raccolti a maggio-luglio con spermatozoi progressivi in numero maggiore nel periodo marzo-maggio. Morte e colleghi<sup>(68)</sup> hanno avuto le stesse conferme. Altri<sup>(98)</sup> invece non hanno riscontrato alcuna variazione nella qualità del seme raccolto in stagioni differenti. Questa discrepanza potrebbe essere dovuta al fatto che Wrench e colleghi<sup>(98)</sup> hanno analizzato solo eiaculati raccolti nei mesi di giugno, settembre, dicembre e marzo invece che seme raccolto tutto l'anno.

Gamboa e colleghi(77) hanno affermato che i cavalli lusitani presentano una qualità spermatica analoga al puro-sangue spagnolo adducendo la giustificazione della comune origine. Comunque, d'accordo con Agricola e colleghi(99) la funzione e la dimensione testicolare degli stalloni lusitani erano massime in primavera ma il volume testicolare era il più piccolo ad ottobre mentre la produzione spermatica continuava a diminuire fino a gennaio. I risultati indicano che alle nostre condizioni climatiche e geografiche è preferibile congelare il seme durante il periodo inverno/primavera. La qualità del seme variava notevolmente da un singolo stallone ad un altro. L'effetto stallone è stato confermato da diversi altri studi (70,77,80,97). Diversi studi hanno analizzato l'effetto dell'età degli stalloni sulla qualità degli eiaculati recuperati (19,47,48). Nello studio i soggetti più giovani eiaculavano una quantità inferiore di seme contenente un numero inferiore di spermatozoi mentre i soggetti più vecchi presentavano un eiaculato maggiore con un numero superiore di spermatozoi totali. Comunque i due gruppi mostravano una motilità spermatica simile negli eiaculati. Questi risultati sono parzialmente in accordo con il lavoro di Dowsett e Knott(19). Nello studio è stato mostrato che un intervallo di 2-3 giorni tra prelievi è il più favorevole per massimizzare le prestazioni riproduttive dello stallone.

1. Pickett B.W. Factors affecting sperm production and output. In McKinnon A.O. and Voss J.L. (eds), *Equine Reproduction*, Philadelphia: Lea & Febiger. Chapter 78 pp.689-704, 1993.
2. Johnson L., Blanchard T.L., Varner D.D. and Scrutchfield W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* 1997;48:1199-216.
3. Squires E.L. and Pickett B.W. Factors affecting sperm production and output. In: McKinnon A O, Squires E L, Vaala W E, Varner D D. *Equine reproduction*, II ed, Wiley-Blackwell, 2011.
4. Pickett B.W., Faulkner L.C., Seidel G.E. Jr, Berndtson W.E. and Voss J.L. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. *J Anim Sci* 1976;43:617-25.
5. Sullivan J.J. and Pickett B.W. Influence of ejaculation frequency of stallions on characteristics of semen and output of spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;23:29-34.
6. Jasko D.J., Lein D.H. and Foote R.H. The repeatability and effect of season on seminal characteristics and computer-aided sperm analysis in the stallion. *Theriogenology* 1991;35:317-27.

7. Johnson L., Varner D.D., Tatum M.E. and Scrutchfield W.L. Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallions. *Biol Reprod* 1991;45:404-10.
8. Steward B.L. and Roser J.F. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. *Domest Anim Endocrinol* 1998;15(2):129-39.
9. Hoffmann B. and Landeck A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Anim Reprod Sci* 1999;57:89-98.
10. Thompson D.L.Jr, Pickett B.W., Squires E.L. and Amann R.P. Testicular measurements and reproductive characteristics in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:13-17.
11. Amann R.P., Thompson D.L.Jr, Squires E.L. and Pickett B.W. Effect of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:1-6.
12. Squires E.L., Pickett B.W. and Amann R.P. Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:1-6.

13. Gebauer M.R., Pickett B.W. and Swierstra E.E. Reproductive physiology of the stallion. III. Extra-gonadal transit time and sperm reserves. *J Anim Sci* 1974;39:737-42.
14. Amann R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl* 1981;2:37-58.
15. Coulter G.H., Rounsaville T.R. and Foote R.H. Heritability of testicular size and consistency in Holstein bulls. *J Anim Sci* 1976;43:9-12.
16. Love C.C., Garcia M.C., Riera F.R. and Kenney R.M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *J Reprod Fertil Suppl* 1991;44:99-105.
17. Pickett B.W., Amann R.P., McKinnon A.O., Squires E.L. and Voss J.L. Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. II. *Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 05. Fort Collins, Colorado State University, 1989.*
18. Jones L.E. and Berndtson W.E. A quantitative study of Sertoli cell and germ cell population as related to sexual development and aging in the stallion. *Biol Reprod* 1986;35:138-48.

19. Dowsett K.F. and Knott L.M. The influence of age and breed on stallion semen. *Theriogenology* 1996;46:397-412.
20. Bielanski W. Results of extensive researches of the semen of stallions. 3rd Int Cong Anim Reprod 1956; 65-67.
21. Hendrikse J. Het sperma van normaal bevruchtende dekhengsten. The sperm of normally fecundating stallions. *Tijdschr Diergeneesk Deel* 91 1966; afl 5:300-313.
22. Nishikawa Y. and Waide Y. On artificial insemination in the horse. V. On the properties of semen and the factors affecting them. *Bull Nat Inst Agric Sci (Ser G)* 1951; Nol:13-28.
23. Pickett B.W. Reproductive evaluation of the stallion. In: McKinnon AO, Voss JL (eds), *Equine Reproduction* Philadelphia, London: Lea and Febiger, 1993;755-768.
24. Skinner E.L. and Bowen J. Puberty in the Welsh stallion. *J Reprod Fertil* 1968; 16:133-135.
25. Bielanski W. Characteristics of the semen of stallions. Macro- and microscopic investigations with estimation of fertility. *Mem Acad Pol Sci* 1950; 16:1-58.



26. Bielanski W. Reproduction in horses. 1. Stallions. The results of investigations conducted at the Institute of Zootechnics and at the Agricultural College in Krakow. Instytut Zootechniki Dział Dokumentacji Naukowej. Wydawnictwa Wlasne 1960; 116:1-23.
27. Nishikawa Y. Studies on reproduction in horses. Singularity and artificial control in reproductive phenomena. Japan Racing Association, Shiba Tamuracho Minatoku, Tokyo, Japan, 1959; 206-276.
28. Pickett B.W. and Voss J.L. Reproductive management of the stallion. Colorado State University, Experiment Station in cooperation with Animal Reproduction Laboratory. 1973; General Series 934:501-531.
29. Pickett B.W., Faulkner L.C. and Sutherland T.M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behaviour. J Anim Sci 1970; 31:713-728.
30. Pickett B.W., Faulkner L.C. and Voss J.L. Effect of season on some characteristics of stallion semen. J Reprod Fertil 1975; 23 (Suppl):25-28.
31. Thompson D.L., Pickett B.W., Berndtson W.E., Voss J.L. and Nett T.M. Reproductive physiology of the stallion. VIII. Artificial photoperiod, collection interval and seminal characteristics, sexual behaviour and

- concentrations of LH and testosterone in serum. J Anim Sci 1977;44:656-664.
- 32.Voss J.L., Squires E.L., Pickett B.W. and Amann R.P. Factors affecting reproductive performance of the stallion. Proc 25th Amer Assoc Equine Pratt 1979; 33-49.
- 33.Bowen J.M. Artificial insemination in the horse. Equine Vet J 1969; 1:96-110.
- 34.Jackson A.E. and Dowsett K.F. Proliferating cell nuclear antigen in the equine testis: effects of age and experimental treatment. Proc VIth Int Symp Eq Reprod 1994; 155-156.
- 35.Orgebin-Crist M.C. Studies on the function of the epididymis. Biol Reprod 1969; 1:155-175.
- 36.Paufler S.K. and Foote R.H. Morphology, motility and fertility of spermatozoa recovered from different areas of ligated rabbit epididymides. J Reprod Fertil 1968; 17:125-137.
- 37.Ley W.B. Method of predicting stallion to mare ratio for natural and artificial insemination programs. J Equine Vet SC 1985; 5:143-146.

38. Dowsett K.F. and Pattie W.A. Characteristics and fertility of stallion semen. J Reprod Fert 1982; 32 (Suppl):1-8.
39. Asbury A.C. and Hughes J.P. Use of the artificial vagina for equine semen collection. J Am Vet Med Ass 1964; 144:879-882.
40. Pickett B.W. Collection and evaluation of stallion semen. Proc 2nd Tech Conf Artif Insem Reprod 1968; 80-87.
41. Voss J.L., Pickett B.W. and Squires E.L. Stallion spermatozoa morphology and motility and their relationship to fertility. J Am Vet Med Assoc 1981; 178:287-289.
42. Chenoweth P.J., Pascoe R.R.R., McDougall H.L. and McCosker P.J. An abnormality of spermatozoa of a stallion (*EQUUS caballus*). Br Vet J 1970; 126:476-461.
43. Lowe J.E., Baldwin B.H., Foote R.H., Hillman R.B. and Kallfelz F.A. Semen characteristics of thyroidectomized stallions. J Reprod Fertil 1975; 23 (Suppl):61-86.
44. Day F.T. The stallion and fertility, the technique of sperm collection and insemination. Vet Ret 1940; 52:597-602.

45. Wierzbowski S. and Hafez E.S.E. Analysis of copulatory reflexes in the stallion. Proc IV<sup>th</sup> Int Cong Anim Reprod 1961; 2:176-179.
46. Gamboa S., Rodrigues A.S., Henriques L., Batista C. and Ramalho-Santos J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. Theriogenology 73 (2010) 950–958.
47. Pickett B.W., Sullivan J.J. and Seidel G.E.Jr. Reproductive physiology of the stallion. V. Effect of frequency of ejaculation on seminal characteristics and spermatozoa output. J Anim Sci 1975;40:917-23.
48. Pickett B.W., Neil J.R. and Squires E.L. The effect of ejaculation frequency on stallion sperm output. Proceedings of Ninth equine Nutritional Physiology Society Symposium, 1985, pp. 290-5.
49. Gebauer M.R., Pickett B.W., Voss J.L. and Swierstra E.E. Reproductive physiology of the stallion: daily sperm output and testicular measurements. J Am Vet Med Assoc 1974; 165:711-13.
50. Thompson J.A., Love C.C., Stich K.L., Brinsko S.P., Blanchard T.L. and Varner D.D. 2004. A Bayesian approach to prediction of stallion sperm output. Theriogenology 2004;62:1607-17.

51. Magistrini M., Chanteloube P.H. and Palmer E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. *J Reprod Fertil Suppl* 1987;35:127-33.
52. Sieme H., Echte A. and Klug E. Effect of frequency and interval of semen collection on seminal parameters and fertility of stallions. *Theriogenology* 2002;58:313-16.
53. Brinsko S.P., Spooner J.A., Blanchard T.L., Love C.C. and Varner D.D. Relationships among sperm membrane integrity, motility, and morphology in first and third ejaculates of sexually rested stallions. *Proceedings of Annual Convention of American Association of Equine Practitioners*, 2004;50:502-4.
54. Sieme H., Katila T. and Klug E. Effect of semen collection practices on semen characteristics before and after storage and on fertility of stallions. *Theriogenology* 2004;61:769-784.
55. Pickett B.W., Voss J.L., Bowen R.A., Squires E.L. and McKinnon A.O. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. *Proceedings of the 33<sup>rd</sup> Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 1987; pp. 487-518.

56. Love C.C. Stallion semen evaluation and interpretation. Proceedings of the Society for Theriogenology, 2002; pp. 93-101.
57. Jasko D.J. Evaluation of stallion semen. Vet Clin N Am Equine Pract 1992;8:129-49.
58. Stout T.A.E. and Colenbrander B. Reproductive parameters of Draft horse, Friesian and warmblood stallions. In: McKinnon A.O., Squires E.L., Vaala W.E., Varner D.D. Equine reproduction, II ed, Wiley-Blackwell, 2011.
59. Morris L.H. and Allen W.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. Equine Vet J 2002;34:51-60.
60. Sieme H., Schafer T., Stout T.A.E., Klug E. and Waberski D. The effects of different insemination regimes on fertility in mares. Theriogenology 2003;60:1153-64.
61. Parlevliet J.M. and Colenbrander B. Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmbloods with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. Equine Vet J 1999;31:248-51.
62. Royal Dutch Friesian Studbook. Yearly Report. (Breeding and Foal Information). <http://www.fps-studbook.com/>, 2008.

63. Van Buiten A., Van Den Broek J., Schukken Y.H. and Colenbrander B.  
Validation of non-return rate as a parameter for stallion fertility. *Livest  
Prod Sci* 1999;60:13-19.
64. Kenney R.M., Hurtgen J., Pierson R., Witherspoon D. and Simons J.  
Theriology and the equine. Part II. The stallion: semen examination. *J  
Soc Theriogenol* 1983;9:1100-10.
65. Colenbrander B., Puyk H., Zandee A.R. and Parlevliet J. Evaluation of the  
stallion for breeding. *Acta Vet Scand Suppl* 1992;88:29-37.
66. Jasko D.J., Little T.V., Lein D.H. and Foote R.H. Comparison of spermatozoal  
movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases  
(1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 1992;200:979-85.
67. Parlevliet J.M., Kemp B. and Colenbrander B. Reproductive characteristics  
and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *J Reprod Fertil*  
1994;101:183-7.
68. Morte M.I., Rodrigues A.M., Soares D., Rodrigues A.S, Gamboa S. and  
Ramalho-Santos J. The quantification of lipid and protein oxidation in  
stallion spermatozoa and seminal plasma: seasonal distinctions and  
correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and  
stallion fertility. *Anim Reprod Sci* 2008;106:36-47.

69. Janett F., Thun R., Niedere K., Burger D. and Hassig M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. *Theriogenology* 2003;60:446–53.
70. Janett F., Thun R., Bettschen D., Burger D. and Hassig M. Seasonal changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. *Anim Reprod Sci* 2003;77:213–21.
71. Hoffmann B. and Landeck A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Anim Reprod Sci* 1999;57:89–98.
72. Breed W.G., Bauer M., Wade R., Thitipramote N., Suwajarat J. and Yelland L. Intra-individual variation in sperm tail length in murine rodents. *J Zool* 2007;272:299–304.
73. Erenpreiss J., Bungum M., Spano M., Elzanaty S., Orbidans J. and Giwercman A. Intra-individual variation in sperm chromatin structure assay parameters in men from infertile couples: clinical implications. *Hum Reprod* 2006;21:2061–4.
74. Lopez-Fernandez C., Crespo F., Arroyo F., Fernandez J.L., Arana P., Johnston S.D. and Gosalvez J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals: II. The stallion. *Theriogenology* 2007;68:1240–50.



75. Cortes-Gutierrez E.I., Crespo F., Gosalvez A., Davila-Rodriguez M.I., Lopez-Fernandez C. and Gosalvez J. DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. *Theriogenology* 2008;69:1022–32.
76. Vidament M., Dupere A.M., Julienne P., Evain A., Noue P. and Palmer E. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology* 1997;48:907–17.
77. Gamboa S., Machado-Faria M. and Ramalho-Santos J. Seminal traits, suitability for semen preservation and fertility in the native Portuguese horse breeds Puro Sangue Lusitano and Sorraia: implications for stallion classification and assisted reproduction. *Anim Reprod Sci* 2009;13:102–13.
78. Jasko D.J., Lein D.H. and Foote R.H. A comparison of two computer automated semen analysis instruments for the evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *J Androl* 1990;11:453–9.
79. Love C.C., Varner D.D. and Thompson J.A. Intra- and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil* 2000;56:93–100.

80. Gamboa S., Rodrigues L., Henriques C., Batista J. and Ramalho-Santos J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. *Theriogenology* 2010;73:950-8.
81. Voss J.L., Squires E.L., Pickett B.W., Shideler R.K. and Eikenberry D.J. 1982. Effect of number and frequency of inseminations on fertility of mares. *J. Reprod. Fertil.* 32 (Suppl.), 53–57.
82. Pattie W.A. and Dowsett K.F. 1982. The repeatability of seminal characteristics of stallions. *J. Reprod. Fertil.* 32 (Suppl.), 9–13.
83. Bielanski, W. and Kaczmarek, F. 1979. Morphology of spermatozoa in semen from stallions of normal fertility. *J. Reprod. Fertil.* 27 (Suppl.), 39–45.
84. Najjar A., Benaoun B., Ezzaouia M., Ben Maâtoug A., Magistrini M. and Ben Mrad M. Determination of Semen and Sexual Behavior Parameters of Arabian Stallions to Be Selected for an Artificial Insemination Program under Tunisian Conditions. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 8 (2): 173-177, 2010.
85. Tibary, A., Bakkoury M., Anouassi A. and Sghiri A. 2005. Examen et évaluation de l'aptitude à la reproduction. In: *Manuels Scientifiques et*

Techniques. Reproduction Equine. Tome II : l'étalon. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, editor. pp: 39-184.

86. Chevalier-Clément F., Hochereau de Rviers M.T., Perreau C. and Magistrini M. 1991. Alterations of the semen and genital tract of infertile stallions. J. Reprod. Fert. Suppl., 44: 657-658.

87. Clément F., Vidament M. and Magistrini M. 1992. Estimation du pouvoir fécondant de l'étalon. Rec. Méd. Vét., 168(11/12): 947-957.

88. Brito L.F.C. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. Clin. Tech. Equine Pract., 6: 249-264.

89. Posor M. 2005. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproduction tract. Theriogenology, 64: 505-509.

90. Jasko, D.J., Lein D.H. and Foote R.H. 1990. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallion: 66 cases (1987-1988). J. Am. Vet. Assoc., 197: 389-394.

91. Downsett K.F., Osborne H.G. and Pattie W.A. 1984. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology, 22: 463-472.

92. Downsett K.F. and Knott L.M. 1996. The influence of age and breed on stallion semen. Theriogenology, 46: 397-412.

93. Card C. 2005. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology*, 64: 558-567.
94. Pesch S., Bostedt H. and Failing K. 2006. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Anim. Reprod. Sc.*, 91: 285-298.
95. Love C.C., Varner D.D. and Thompson J.A. 2000. Intra and inter-variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 56: 93-100.
96. Akourki A., Echegaray A. and Mitjana O. Seminal Characteristics in Spanish Purebred Stallions: A Retrospective Study. *Journal of Equine Veterinary Science* 33 (2013) 649-652.
97. Janett F., Burkhardt C., Burger D., Imboden I., Hässig M. and Thun R. Influence of repeated treadmill exercise on quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* 2006;65:1737-49.
98. Wrench N., Pinto C.R.F., Klinefelter G.R., Dix D.J., Flowers W.L. and Farin C.E. Effect of season on fresh and cryopreserved stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2010;119:219-27.

99. Agricola R., Chaveiro A., Robalo Silva J., Horta A. and Moreira da Silva F.  
Seasonal changes in semen quality and freezability in Lusitano stallions: A  
flow cytometric study. *Anim Reprod Sci* 2008;107:302.
100. Kenney R.M., Hurtgen J., Pierson R. et al. (eds): *Manual for Clinical  
Fertility Evaluation of the Stallion*. Hastings, Society for Theriogenology,  
1983.
101. Saacke R.G., Dalton J.C., Nadir S. et al. Relationship of seminal traits  
and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim  
Reprod Sci* 60-61:663-677, 2000.
102. Thundathil J., Meyer R., Palasz A.T. et al. Effect of the knobbed  
acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production.  
*Theriogenology* 54:921-934, 2000.
103. Thundathil J., Palomino J., Barth A. et al. Fertilizing characteristics  
of bovine sperm with flattened or indented acrosomes. *Anim Reprod Sci*  
67:231-243, 2001.
104. Thundathil J., Palasz A.T., Mapletoft R.J. et al. An investigation of  
the fertilizing characteristics of pyriform-shaped bovine spermatozoa.  
*Anim Reprod Sci* 57:35-50, 1999.

105. Thundathil J., Palasz A.T., Barth A.D. et al. The use of in vitro fertilization techniques to investigate the fertilizing ability of bovine sperm with proximal cytoplasmic droplets. *Anim Reprod Sci* 65:181-192, 2001.
106. Colenbrander B., Gadella B.M. and Stout T.A.E. The Predictive Value of Semen Analysis in the Evaluation of Stallion Fertility. *Reprod Dom Anim* 38, 305–311, 2003.
107. Morris L.H.A. and Allen W.R. An overview of low dose insemination in the mare. *Reprod Dom Anim* 2002;37:206-10.
108. Saacke R.G. Sperm morphology: its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 2008;70:473-8.
109. Courot M. and Colas G. The role of the male in embryonic mortality (cattle and sheep). In: Greenan JM, Diskin MG, editors. *Embryonic mortality in farm animals*. Dordrecht: Martinus Nijhoff; 1986. p. 95–203.
110. Kenny R.M. *Manual for clinical fertility evaluation of the stallion*. Hastings N.E.: Society for theriogenology, 1983, pp. 3-100.

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **MATERIALI E METODI**

La ricerca ha avuto luogo presso il Dipartimento di Ricerca per L'Incremento Ippico, Ozieri (40°58'), durante le stagioni di monta 2010, 2011, 2012 e 2013 su 16 stalloni mantenuti in box singoli ed alimentati con fieno ad libitum e un'equilibrata integrazione di alimenti commerciali. I soggetti appartenevano a diverse razze: 7 Anglo-Arabo, 5 Sella, 2 Purosangue Inglese e 2 Purosangue Arabo. L'età degli stalloni era di  $17 \pm 5,96$  anni (media  $\pm$  deviazione standard; range 7-26), il peso corporeo di  $570,88 \pm 58,33$  kg (media  $\pm$  deviazione standard; range 460-678) ed il body condition score di  $6,05 \pm 1,12$  (media  $\pm$  deviazione standard; range 4,33-8,00). All'inizio dello studio gli stalloni sono stati classificati in 3 classi di età: 8 stalloni di età  $\leq 15$ ; 5 stalloni di età compresa tra 16 e 19 anni; 3 stalloni di età  $\geq 20$ . Nell'arco del periodo di studio gli stalloni, con l'avanzare dell'età, potevano ricadere nella classe di età successiva e tale aspetto è stato considerato per la valutazione dei dati. In Sardegna la stagione di monta ha inizio il 15 febbraio e ha termine il 30 giugno. All'inizio del mese di febbraio nel centro di inseminazione equina gli stalloni sono stati sottoposti a un prelievo giornaliero del seme per 5 giorni consecutivi in previsione del loro utilizzo durante l'intera stagione di monta e con la finalità di stabilire un numero approssimativo di fattrici da attribuire ad ogni stallone. Successivamente gli stalloni sono stati prelevati in base alle richieste di materiale seminale nelle

giornate di lunedì, mercoledì e venerdì salvo eccezioni legate alle festività. Il prelievo del materiale seminale avveniva mediante l'utilizzo di una vagina artificiale INRA modificata su manichino o su una cavalla in calore a seconda delle esigenze del singolo stallone. Il personale impiegato nel corso dei prelievi era sempre lo stesso. Nel corso del prelievo del seme venivano registrati i dati relativi al numero di tentativi di monta effettuati dallo stallone. Il seme così ottenuto veniva sottoposto ad esame mediante l'utilizzo di un sistema CASA (Sperm Class Analyzer®) finalizzato all'ottenimento dei principali parametri seminali: volume gel-free, concentrazione, percentuale di spermatozoi motili, percentuale di spermatozoi motili progressivi. Una volta diluito nel medium standard INRA96® il materiale seminale veniva sottoposto a valutazione della percentuale degli spermatozoi motili e motili progressivi alle 24 e 48 ore dal prelievo del seme. All'inizio e alla conclusione della stagione di monta 2013 su ogni stallone è stata effettuata un'analisi morfologica del materiale seminale mediante microscopio ottico. Nel primo caso la valutazione veniva effettuata sull'ultimo prelievo di una serie di 5 prelievi consecutivi precedente l'inizio della stagione di monta mentre nel secondo caso sull'ultimo prelievo effettuato con finalità commerciali durante la stagione di monta. Sono stati posti 10 µl di materiale seminale su un vetrino per poi lasciarli asciugare a temperatura ambiente. I campioni sono stati sottoposti a colorazione Diff-Quick e successivamente è stato rimosso il colorante in eccesso mediante acqua corrente.



I vetrini sono stati lasciati asciugare lentamente a temperatura ambiente. È stato utilizzato un ingrandimento 100x in immersione e sono stati valutati 200 spermatozoi nell'area centrale del vetrino catalogando i difetti analogamente a Card<sup>(1)</sup> e Veeramachaneni e colleghi<sup>(2)</sup>. Laddove presenti più difetti per spermatozoo questi sono stati indicati e classificati. Nel corso della stagione di monta 2013 i 16 stalloni oggetto dello studio, mantenuti in box singoli e senza la presenza di fattrici nelle vicinanze, sono stati sottoposti ad un prelievo mensile tra le 7.00 e le 7.30 del mattino per il dosaggio del testosterone. I quattro campioni, ottenuti mediante l'utilizzo di vacutainer, sono stati centrifugati ed il siero, inviato refrigerato, è stato impiegato per l'effettuazione dell'analisi mediante tecnica di spettrofotometria di massa da parte del *Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco* (via Sorio 114/c, 35141 Padova). Al fine di valutare la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene sono stati effettuati dei prelievi alle ore 17.00 del 05/05/2013 per la valutazione del cortisolo basale e del dosaggio dell'ACTH endogeno. I prelievi sono stati immediatamente seguiti dalla somministrazione di desametasone al dosaggio di 0,04 mg/kg (20 mg/cavallo di 500 kg). Dopo 19 ore, ovvero alle 12.00 del giorno successivo per ogni stallone è stato effettuato un prelievo finalizzato al dosaggio del cortisolo post-desametasone. I campioni per la valutazione del cortisolo basale e del cortisolo post-desametasone sono stati sottoposti a centrifugazione e spediti refrigerati al *Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco* dove è stata effettuata

una valutazione mediante tecnica di spettrofotometria di massa tandem. Per quanto concerne il dosaggio dell'ACTH endogeno sono state utilizzate delle provette con K3EDTA arricchite da una quantità standard di aprotinina necessaria ad evitare la degradazione dell'ACTH da parte delle proteasi plasmatiche. Anche in questo caso i campioni sono stati inviati refrigerati al *Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco*. Tra il 10 e il 15 giugno gli stalloni sono stati sottoposti ad esame particolare dell'apparato riproduttore. È stato effettuato un esame visivo seguito dalla palpazione degli organi genitali esterni per l'eventuale riscontro di patologie in corso. È stato possibile effettuare la misurazione della larghezza scrotale totale e della lunghezza dei singoli testicoli. 14 stalloni sono stati oggetto di valutazione ecografica del contenuto scrotale senza la necessità della sedazione mentre nel caso dei due stalloni rimanenti non è stato possibile effettuare l'esame per i rischi connessi al carattere dei soggetti e si è preferito evitare l'esame ecografico dopo sedazione per non alterare i parametri ottenibili. È stato utilizzato l'ecografo Micromaxx Sonosite (SonoSite, Inc. 21919 30th Drive SE Bothell, WA 98021 USA). L'esame ecografico ha permesso di valutare eventuali anomalie degli organi oggetto dello studio e si è reso fondamentale nella valutazione della larghezza ed altezza dei singoli testicoli, parametri utili per il calcolo della potenziale produzione spermatica giornaliera. Lo studio ha interessato la valutazione del parenchima testicolare ed il suo grado di ecogenicità mentre, in corrispondenza del cordone spermatico,

sono stati rilevati i principali parametri dell'arteria testicolare. È stata utilizzata una sonda lineare da 7.5 Mhz con caratteristiche ergonomiche che, per questo particolare utilizzo, la rendono più adatta rispetto ad una sonda convex o settoriale. Dopo aver lubrificato la superficie cutanea mediante una abbondante quantità di gel è stata apposta la sonda lineare con direzione trasversale rispetto alla direzione del cordone spermatico e parallela al terreno. È stata dapprima valutata la presenza di anomalie della regione e, tra queste, l'eventuale presenza di varicocele mediante tecnica M-mode per poi valutare l'arteria testicolare secondo sezioni di taglio trasversale. È stata effettuata la misurazione del diametro dell'arteria testicolare e, successivamente, sulla stessa sono stati registrati i principali parametri mediante eco-color-doppler: picco di velocità sistolica, velocità diastolica finale, indice di resistività, indice di pulsatilità, il flusso arterioso totale e le caratteristiche della forma dell'onda del flusso ematico testicolare. Sono state effettuate 3 diverse valutazioni di tutti i parametri dell'arteria testicolare questo in quanto viene ritenuto tecnicamente complesso ottenere valori ripetibili delle misurazioni doppler del flusso sanguigno arterioso. Infatti la maggior parte degli autori utilizzano le medie di 2-7 diversi valori(47,48,49-introduzione).

### Analisi statistica

Per tutti gli stalloni sono stati utilizzati i dati di un prelievo mensile distante non meno di 3 giorni e non più di 10 giorni dal precedente prelievo. Per la

valutazione dei parametri seminali in relazione alle classi di età e alla razza e per la valutazione delle caratteristiche dell'arteria testicolare in relazione alle classi di età è stato utilizzato il test di analisi della varianza mono-fattoriale basato su un confronto tra medie con applicazione del test  $\tau$ -student.

1. Card C. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. *Theriogenology* 64:558-567, 2005.
2. Veeramachaneni D.N., Moeller C.L., Sawyer H.R. Sperm morphology in stallions: ultrastructure as a functional and diagnostic tool. *Vet Clin North Am Equine Pract* 22:683-692, 2006.

## SCOPO DEL LAVORO

La presente tesi di dottorato ha voluto analizzare le caratteristiche seminali in un gruppo di stalloni nell'arco di un periodo temporale di 4 anni così da valutare, una volta esclusi i principali stati patologici nel corso del periodo stesso, una eventuale ripetibilità del dato durante stagioni di monta consecutive.

Oltre allo studio sulla possibile ripetibilità intra-individuale dei principali parametri seminali si è voluto ricercare l'effetto di età e razza sugli stessi nonché l'andamento delle caratteristiche del seme all'interno della stessa stagione di monta.

Oggetto della ricerca è stata anche la valutazione delle possibili correlazioni tra le stesse caratteristiche seminali e determinati ormoni potenzialmente in grado di fungere da marker dello stato riproduttivo dei soggetti o, ad ogni modo, essere indicativi della fertilità degli stessi. Seguendo tale percorso si è andati a valutare le concentrazioni di testosterone, di ACTH e di cortisolo. In particolare si è voluto speculare sul fatto che condizioni di alterata produzione ormonale, su soggetti altrimenti clinicamente sani, siano in grado di determinare un cambiamento delle caratteristiche riproduttive degli stalloni.

Un ulteriore obiettivo della ricerca è stato quello di approfondire l'utilità di nuovi strumenti diagnostici che potrebbero essere d'ausilio nella determinazione della fertilità degli stalloni o in corso di sospetta ipofertilità di questi. Pertanto si è ricorso all'utilizzo di una tecnica non invasiva e potenzialmente poco costosa, quale l'ecografia e in particolare l'eco-doppler, per ottenere parametri correlabili con le caratteristiche seminali degli stalloni mediante uno screening diagnostico atto a valutarne il potenziale futuro utilizzo sul campo.

## RISULTATI

### 1. Effetto dei parametri “mese ed anno di prelievo”: valutazione della ripetibilità dei parametri seminali

Le caratteristiche seminali degli stalloni sono state valutate nel corso di 4 anni dal 2010 al 2013 ed è stato possibile riscontrare un calo significativo degli spermatozoi motili alle 24 e 48 ore col decorrere degli anni. Nel pool di stalloni è stato anche possibile evidenziare la tendenza ad un aumento del volume gel-free nel corso del periodo suddetto, con il volume minimo nel corso dell'annata 2010 e massimo in quella 2012 (Tabella 1).

Tabella 1. Analisi della produzione e della qualità del seme distinta per anno

Parametri		Anno			
		2010	2011	2012	2013
<b>Volume gel free</b>	MI	30,7 2,6 <b>b</b>	32,4 2,6 <b>ab</b>	40,4 2,7 <b>a</b>	37,4 2,9 <b>ab</b>
<b>Concentrazione</b>	n.x10 <sup>6</sup> /ml	368 37	342 36	398 37	338 41
<b>Totale spz</b>	n.x10 <sup>9</sup>	9,9 0,9	9,7 0,9	12,3 0,9	10,3 1,0
<b>spz motili</b>	%	88,4 1,8	84,7 1,8	84,6 1,9	83,3 2,0
<b>spz motili 24h</b>	%	78,5 2,7 <b>a</b>	76,1 2,6 <sup>o</sup>	77,0 2,7 <b>a</b>	65,9 3,0 <b>b</b>
<b>spz motili 48h</b>	%	72,8 3,1 <b>a</b>	67,5 3,0 <b>a</b>	69,8 3,1 <b>a</b>	56,3 3,4 <b>b</b>
<b>spz prog. Motili</b>	%	45,8 2,0	44,7 2,0	50,7 2,1	50,8 2,2
<b>spz prog. motili 24h</b>	%	40,0 2,0	39,8 1,9	37,8 2,0	37,7 2,2
<b>spz prog. motili 48h</b>	%	35,4 2,0	32,2 1,9	34,0 2,0	31,4 2,2

a,b = differenze significative per P<0,05.

L'andamento delle caratteristiche seminali dello stesso pool di stalloni è stato valutato in funzione dei mesi di interesse della stagione di monta riscontrando una tendenza ad un graduale aumento della produzione spermatica col passare dei mesi. In Tabella 2 è facilmente evidenziabile quanto il dato sia stato influenzato soprattutto da un incremento del volume gel-free piuttosto che dalla

concentrazione spermatica che, al contrario, non veniva alterata col passare dei mesi.

Tabella 2. Analisi della produzione e della qualità del seme distinta per mese di prelievo

Parametri		Mese			
		Marzo	Aprile	maggio	giugno
<b>Volume gel free</b>	MI	34,1 2,9	32,1 2,7	37,5 2,7	36,3 2,6
<b>Concentrazione</b>	n.x10 <sup>6</sup> /ml	359 40	377 37	343 38	368 36
<b>Totale spz</b>	n.x10 <sup>9</sup>	9,7 1,0	10,0 0,9	11,1 0,9	11,3 0,9
<b>spz motili</b>	%	85,1 2,0	85,2 1,9	85,9 1,9	85,3 1,8
<b>spz motili 24h</b>	%	74,9 3,0	73,1 2,8	75,6 2,8	75,7 2,7
<b>spz motili 48h</b>	%	67,7 3,4	64,7 3,2	68,7 3,2	68,0 3,2
<b>spz prog. Motili</b>	%	44,6 2,2	47,3 2,1	50,0 2,1	44,6 2,2
<b>spz prog. motili 24h</b>	%	38,3 2,1	36,9 2,0	40,3 2,0	40,0 2,0
<b>spz prog. motili 48h</b>	%	34,0 2,1	30,6 2,0	34,3 2,0	34,4 2,0

Lo studio ha voluto approfondire l'andamento individuale delle caratteristiche seminali e, per via del numero di stalloni da valutare, si è preferito rappresentare graficamente tale andamento con gli stalloni all'interno delle classi di età di appartenenza. Sono stati considerati i seguenti parametri: motilità e motilità progressiva alle 0 ore, motilità e motilità progressiva alle 24 ore e motilità e motilità progressiva alle 48 ore. Le tabelle sono presenti in allegato.

## 2. Effetto del fattore "razza" sui parametri seminali



Gli stalloni sono stati raggruppati per razza ed è stato possibile riscontrare una qualità del seme significativamente migliore nei soggetti di razza anglo-araba. Tuttavia mentre tale valutazione è possibile in un confronto tra i 7 stalloni anglo-arabi ed i 5 stalloni di razza sella, essa è di più difficile interpretazione quando relazionata ai 2 stalloni arabi ed ai 2 stalloni purosangue inglese in relazione al ridotto numero di soggetti presenti. Nel presente studio negli stalloni anglo-arabi sono stati riscontrati valori significativamente superiori per quanto concerne il numero totale degli spermatozoi e gli spermatozoi motili a 0, 24 e 48 ore dal prelievo. Gli stalloni di razza sella hanno evidenziato una motilità progressiva significativamente migliore ( $P < 0,05$ ). Questi dati possono essere esaminati in Tabella 3.

Tabella 3. Analisi della produzione e della qualità del seme distinta per razza

Parametri		Razza			
		Anglo arabo	Purosangue arabo	Purosangue inglese	Sella
Volume gel free	MI	35,2 1,8ab	29,6 3,7b	46,5 4,6a	33,4 2,7ab
Concentrazione	n.x10 <sup>6</sup> /ml	427 24°	280 49bc	107 60c	354 35
Totale spz	n.x10 <sup>9</sup>	12,7 0,6a	8,1 1,2b	4,8 1,5b	9,0 0,9b
spz motili	%	88,9 1,1a	77,0 2,3b	69,4 2,8b	87,7 1,7a
spz motili 24h	%	79,1 1,4a	67,8 3,0b	35,2 3,6c	52,9 1,9a
spz motili 48h	%	72,3 1,6a	60,2 3,2b	17,5 3,9c	76,9 2,3a
spz prog. Motili	%	50,4 1,3a	37,4 2,6b	32,5 3,2b	52,9 1,9a
spz prog. motili 24h	%	40,9 1,1b	32,4 2,3c	15,3 2,8d	46,4 1,7a
spz prog. motili 48h	%	35,5 1,0b	28,2 2,1c	5,3 2,5d	41,2 1,5a

a,b = differenze significative per  $P < 0,05$

La scarsa rappresentatività dei soggetti di razza araba e purosangue inglese ha indirizzato lo studio ad un raffronto diretto tra le razze anglo-araba e sella. In tal caso il confronto tra le due razze è stato effettuato in funzione dell'anno di prelievo e ciò ha permesso di evidenziare una maggiore produzione di spermatozoi totali ( $p < 0,05$ ) negli stalloni anglo-arabi, dato determinato da concentrazione e volume gel-free significativamente maggiori, mentre i soggetti di razza sella hanno presentato una migliore motilità progressiva durante le stagioni di monta 2010 e 2011 ( $p < 0,05$ ).

Nella Tabella 4 è anche evidente la ripetibilità del dato riferito alla motilità dei soggetti anglo-arabi nel corso degli anni rispetto agli stalloni di razza sella dove sono invece presenti maggiori oscillazioni.

Tabella 4. Qualità sperma per razza e per anno di prelievo

Razza	Anno	Volume	Concentrazione	Spz totali	Motili	Prog. motili
		Ml	n. x 10 <sup>6</sup> /ml	n. x 10 <sup>9</sup>	%	%
Anglo Araba	2010	33,9 1,4 <sup>o</sup>	403 28	11,7 0,6 <b>ab</b>	89,7 0,7	46,8 1,0 <b>bB</b>
	2011	35,6 1,3	412 26	12,7 0,6 <b>ab</b>	89,6 0,7	46,5 0,9 <b>bB</b>
	2012	36,1 1,4	466 28	13,4 0,6 <sup>o</sup>	88,1 0,7	53,9 1,0 <b>a</b>
	2013	35,6 1,6	457 31	10,5 0,7 <b>b</b>	86,5 0,8	55,8 1,1 <sup>o</sup>
	<b>Complesso</b>	35,3 0,7 <b>A</b>	434 14 <sup>o</sup>	12,1 0,3 <b>A</b>	88,4 0,4	51,0 0,5 <b>B</b>
Sella	2010	26,9 1,7 <b>bB</b>	393 34	9,2 0,8	89,1 0,9 <b>b</b>	56,0 1,2 <b>A</b>
	2011	31,5 1,7 <b>b</b>	375 33	10,9 0,8	92,8 0,9 <b>a</b>	54,3 1,2 <sup>o</sup>
	2012	39,6 1,8 <sup>o</sup>	373 36	11,3 0,8	89,1 0,9 <b>b</b>	56,0 1,3
	2013	32,3 2,1 <b>ab</b>	343 41	9,3 0,9	87,2 1,1 <b>b</b>	58,8 1,5
	<b>Complesso</b>	32,6 0,9 <b>B</b>	371 18 <b>B</b>	10,2 0,4 <b>B</b>	89,6 0,5	56,3 0,7 <b>A</b>

a,b,c = differenze per  $P < 0,05$  tra anni entro la stessa razza;

A,B = differenze per  $P < 0,05$  tra razza entro lo stesso anno o nel complesso.

### 3. Effetto del fattore “età” sui parametri seminali

Oggetto dello studio è stato anche l’effetto dell’età sui parametri seminali e, come evidenziabile in Tabella 5, è stato possibile riscontrare una diminuzione del volume gel-free nei soggetti di età uguale o superiore a 20 anni tuttavia bilanciato da un aumento della concentrazione spermatica ( $P<0,05$ ). Gli stalloni della classe di età intermedia hanno presentato una qualità del materiale seminale significativamente migliore per quanto riguarda in particolare le percentuali di spermatozoi motili e progressivi alle 24 e 48 ore ( $P<0,05$ ).

Tabella 5. Qualità del seme distinto per classi di età

Parametri		Età (anni)		
		≤15	16-19	≥20
<b>Volume gel free</b>	ml	36,4 2,2a	38,5 2,1a	26,7 2,8b
<b>Concentrazione</b>	n.x10 <sup>6</sup> /ml	332 30b	298 28b	519 38a
<b>Totale spz</b>	n.x10 <sup>9</sup>	11,1 0,8	9,3 0,7	11,5 1,0
<b>spz motili</b>	%	84,0 1,6	85,9 1,5	86,7 2,0
<b>spz motili 24h</b>	%	70,6 2,3	78,4 2,2	75,3 3,0
<b>spz motili 48h</b>	%	62,2 2,7b	71,2 2,6°	67,6 3,4ab
<b>spz prog. Motili</b>	%	44,7 1,7	51,0 1,6	46,5 2,1
<b>spz prog. motili 24h</b>	%	35,6 1,7b	42,5 1,6°	37,8 2,1ab
<b>spz prog. motili 48h</b>	%	29,5 1,6b	37,2 1,6°	32,8 2,1ab

a,b = differenze significative per  $P<0,05$

Le 3 figure di seguito mostrano graficamente il trend durante i mesi della stagione di monta per quanto riguarda i parametri volume gel-free, concentrazione spermatica e numero totale degli spermatozoi.

Figura 1. Volume gel-free per classi di età e mese della stagione di monta

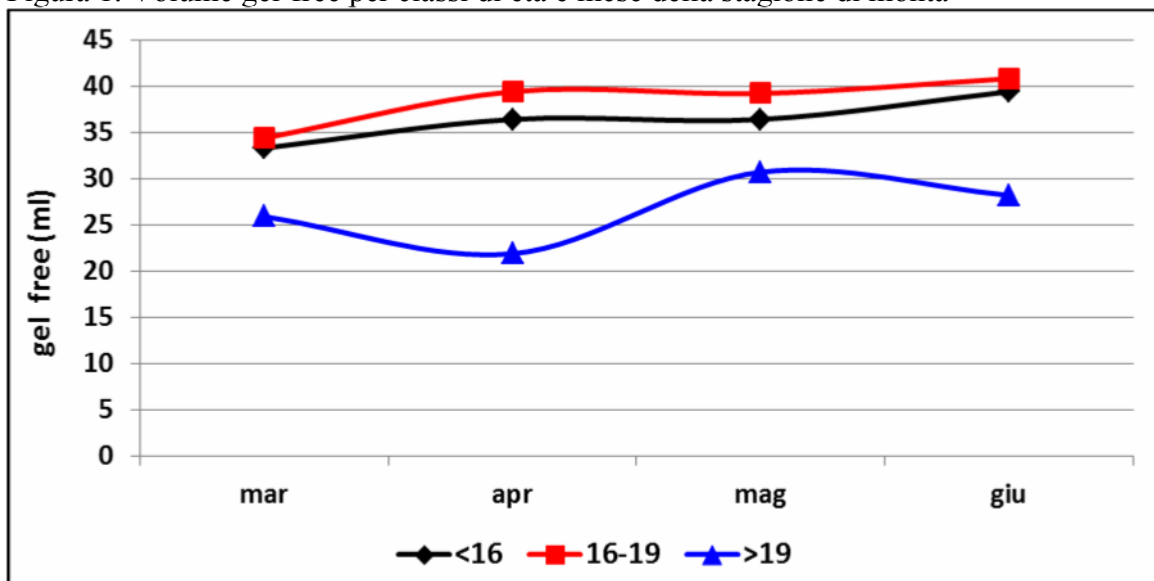


Figura 2. Concentrazione degli spermatozoi per classe di età e mese della stagione di monta

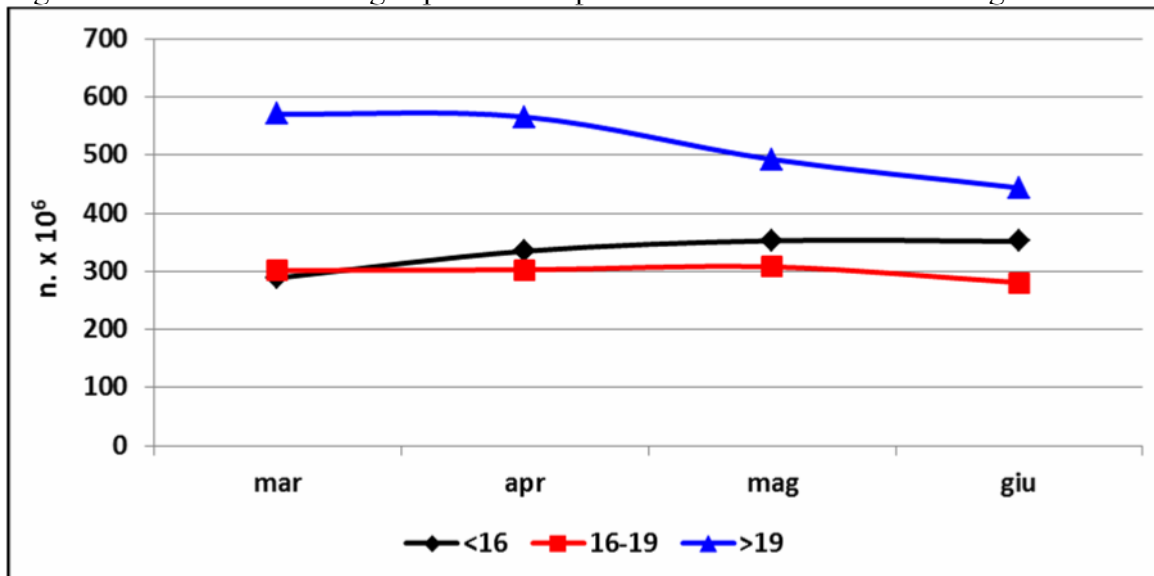
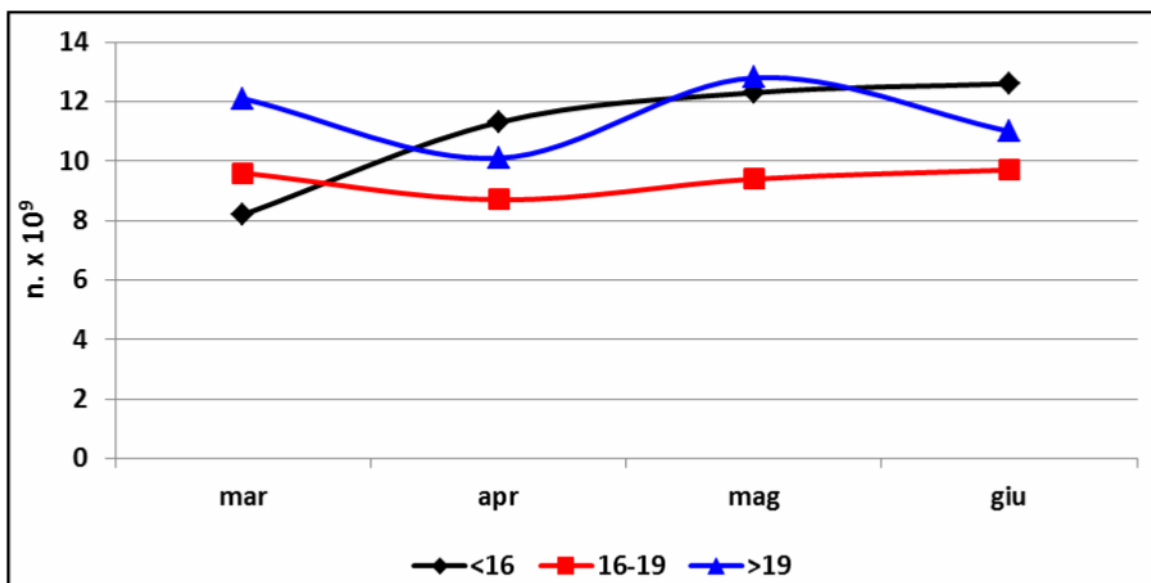


Figura 3. N° spermatozoi totali per classi di età e mese della stagione di monta



Si è resa possibile una ulteriore valutazione del fattore “età” mediante una classificazione dei soggetti con frequenza di prelievo simile, ovvero 1 prelievo ogni 2-3 giorni durante l’arco temporale aprile-maggio. Gli stalloni sono stati distribuiti in diverse classi di età. I dati, rappresentati in Tabella 6, hanno confermato che gli stalloni di 20 anni ed oltre avevano volumi gel-free più bassi rispetto alle altre classi di età ma concentrazioni spermatiche più elevate ( $P < 0,05$ ). I due parametri posti in relazione hanno rivelato un numero totale di spermatozoi statisticamente più elevato in questi stalloni rispetto alle altre fasce di età. All’interno degli stalloni di età  $\geq 20$  è stato anche riscontrato una concentrazione significativamente minore nel mese di maggio rispetto al precedente mese di aprile, aspetto non evidenziato per i soggetti di altre classi di età.

Tabella 6. Qualità sperma per classi di età e per mese di prelievo da stalloni con alta intensità di utilizzo

Classe di età	Mese	Volume ml	Concentrazione n. x 10 <sup>6</sup> /ml	Spz totali n. x 10 <sup>9</sup>	Motili %	Prog. Motili %
≤12	Aprile	45,9 1,7a	329 21b	12,3 0,6a	85,3 0,8b	41,4 1,1bB
	Maggio	49,7 1,6a	278 19b	10,9 0,6ab	86,5 0,8b	46,8 1,0bA
13-16	Aprile	35,3 1,8b	274 21b	9,4 0,6c	84,5 0,9b	50,2 1,1a
	Maggio	35,5 1,7b	285 21b	10,0 0,6b	84,4 0,9b	48,3 1,1b
17-19	Aprile	40,9 1,3b	327 16b	9,9 0,5c	89,2 0,7a	53,9 0,9a
	Maggio	17,1 2,6c	317 16b	10,6 0,5b	87,3 0,7b	54,1 0,8a
≥20	Aprile	17,1 2,6c	960 31aA	15,9 0,9a	93,1 1,3a	54,5 1,6a
	Maggio	17,2 2,3c	823 27aB	13,6 0,8a	92,5 1,1a	58,0 1,4a

a,b,c = differenze per P<0,05 tra classi di età entro lo stesso mese di prelievo;  
A,B = differenze per P<0,05 tra mese di prelievo entro la stessa classe di età

#### 4. Valutazione della morfologia spermatica

L'esame della morfologia spermatica non è stato affrontato sul piano statistico ma è stato comunque possibile evidenziare una frequenza di anomalie spermatiche maggiore in alcuni stalloni. In particolar modo la tecnica si è rivelata utile nell'identificazione di alcuni stalloni problema caratterizzati da parametri seminali al disotto dello standard. Come evidente dalla tabella 7, lo stallone 16 ha evidenziato un elevato numero di spermatozoi con aplasia del pezzo intermedio mentre lo stallone 9 un numero particolarmente ridotto di spermatozoi normali. L'andamento delle caratteristiche seminali dei due stalloni, 16 e 9, viene mostrato in allegato e corrisponde agli stessi numeri nelle classi di età ≤15 e ≥20. La tabella, per via delle dimensioni, viene presentata in allegato.

## 5. Valutazione delle dimensioni testicolari e dei parametri dell'arteria testicolare

La Tabella 7 mostra le correlazioni tra i volumi testicolari e le classi di età.

Tuttavia non sono presenti differenze significative tra i gruppi di età.

Tabella 7. Volume testicolare per classe di età

CLASSI DI ETA'	VOLUME TESTICOLARE SX	VOLUME TESTICOLARE DX	VOLUME TESTICOLARE MEDIO
≤15	252.10	229.80	240.95
16-19	263.77	209.76	236.76
≥20	265.01	275.76	270.39

Le due tabelle seguenti hanno valutato l'effetto dell'età sui parametri dell'arteria testicolare ed è stato evidenziato un marcato effetto dell'età sulla frequenza di TABF dell'arteria testicolare destra. In particolare gli stalloni ≥ 20 anni di età hanno mostrato una frequenza di TABF significativamente inferiore rispetto a stalloni giovani ≤ 15 anni di età ( $P < 0,05$ ) mentre una differenza meno marcata è stata osservata comparando gli stalloni tra 16 e 19 anni e gli stalloni ≥ 20 ( $P < 0,10$ ).

Tabella 8a. Parametri arteria testicolare per classi di età

CLASSI DI ETA'	frequenza di TABF SX	frequenza di TABF DX	frequenza di TABF media	RI SX	RI DX	RI media
≤15	1.00±0.41	1.22±0.17 <sup>a</sup>	1.11±0.25	0.80±0.06	0.74±0.06 <sup>A</sup>	0.77±0.05
16-19	0.87±0.41	1.13±0.50 <sup>A</sup>	1.00±0.41	0.91±0.19	0.91±0.15 <sup>B</sup>	0.92±0.17
≥20	0.73±0.25	0.63±0.20 <sup>Bb</sup>	0.80±0.13	0.89±0.07	0.87±0.12	0.88±0.09

a,b = differenze per  $P < 0,05$  tra classi di età

A,B = differenze per  $P < 0,10$  tra classi di età

Tabella 8b. Parametri arteria testicolare per classi di età

CLASSI DI ETA'	PI SX	PI DX	PI media	PSV SX	PSV DX	PSV media	EDV SX	EDV DX	EDV media
≤15	2.47±0.50	1.89±0.51	2.18±0.38	37.82±5.58	34.61±3.73	36.22±3.72	6.42±1.77	8.66±1.40	7.54±0.98
16-19	5.02±3.58	5.18±4.11	5.10±3.82	40.64±7.12	45.41±11.86	43.02±8.95	2.52±7.86	1.93±7.97	2.22±7.89
≥20	5.26±1.89	4.97±2.46	5.11±1.32	42.65±4.75	39.50±15.87	41.07±9.08	4.54±2.54	4.00±4.59	4.27±3.35

Le caratteristiche dell'onda di flusso ematico testicolare vengono di seguito rappresentate mediante un dato descrittivo e si è preferito evitare di effettuare una punteggiatura del grado dell'onda. Appare tuttavia evidente che i soggetti più anziani mostrino una maggiore resistività dell'onda. È altresì evidente come, nello stesso soggetto l'arteria testicolare possa mostrare un andamento dell'onda di flusso talvolta differente tra testicolo sinistro e destro.



Tabella 9. Caratteristiche individuali dell'onda di flusso ematico testicolare all'interno di classi di età

CLASSI DI ETA'	ETA'	ONDA DI FLUSSO SX	ONDA DI FLUSSO DX
<15	7	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	BIFASICA RESISTIVA
	8	MONOFASICA NON RESISTIVA	MONOFASICA NON RESISTIVA
	11	MONOFASICA NON RESISTIVA	MONOFASICA NON RESISTIVA
	12	BIFASICA RESISTIVA	MONOFASICA NON RESISTIVA
	12	FASICA RESISTIVA	FASICA RESISTIVA
	15	BIFASICA RESISTIVA	BIFASICA RESISTIVA
16-19	18	BIFASICA RESISTIVA	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO
	19	BIFASICA RESISTIVA	FASICA RESISTIVA
	19	ESTREMA BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	ESTREMA BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO
	19	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO
>20	20	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO
	20	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO
	26	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO
	26	ESTREMA BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO	ESTREMA BIFASICA RESISTIVA CON FLUSSO RETROGRADO

## 6. Quadro ormonale degli stalloni oggetto dello studio

Le seguenti tabelle mostrano invece i parametri ormonali esaminati nel presente studio. Dapprima viene presentata la tabella 10 nella quale sono elencati i 16 stalloni e i corrispondenti livelli sierici di ACTH mentre, subito dopo, la tabella 11 nella quale si possono osservare la cortisolemia basale e la cortisolemia conseguente al test di soppressione mediante desametasone. Come evidenziato, è stato possibile identificare 3 stalloni con concentrazioni al di fuori del range di riferimento del laboratorio d'analisi. Tutti e tre gli stalloni presentavano elevate concentrazioni di ACTH ed uno di questi ha mostrato la mancata risposta alla soppressione con desametasone. I tre stalloni facevano parte della classe di età  $\geq$

20. Un aspetto interessante avrebbe potuto essere rappresentato dalla comparazione dei parametri seminali dei 3 stalloni con gli altri stalloni della stessa classe di età così da valutare l'eventuale effetto dello scompenso ormonale ma il numero ridotto dei soggetti negli ipotetici due gruppi ha portato alla rinuncia del tentativo.

Tabella 10. Concentrazioni sieriche dell'ACTH

STALLONI	ACTH	<> ACTH
1	12.0	5.6 / 28.5
2	18.0	5.6 / 28.5
3	25.0	5.6 / 28.5
4	21.0	5.6 / 28.5
5	12.0	5.6 / 28.5
6	14.0	5.6 / 28.5
7	14.0	5.6 / 28.5
8	17.0	5.6 / 28.5
9	47.0	5.6 / 28.5
10	72.0	5.6 / 28.5
11	42.0	5.6 / 28.5
12	17.0	5.6 / 28.5
13	13.0	5.6 / 28.5
14	14.0	5.6 / 28.5
15	12.0	5.6 / 28.5
16	17.0	5.6 / 28.5

Tabella 11. Cortisolemia basale e post-desametasone

STALLONI	CORTISOLO BASALE	<> CORTISOLO BASALE	CORTISOLO POST- DESAMETHASONE	<> CORTISOLO POST- DESAMETASONE
1	4.9	1.2 / 4.5	0.2	< 1.0
2	3.2	1.2 / 4.5	0.6	< 1.0
3	3.9	1.2 / 4.5	0.4	< 1.0
4	3.1	1.2 / 4.5	0.1	< 1.0
5	2.6	1.2 / 4.5	0.2	< 1.0
6	4.3	1.2 / 4.5	0.2	< 1.0
7	2.8	1.2 / 4.5	0.1	< 1.0
8	4.6	1.2 / 4.5	0.3	< 1.0
9	4.9	1.2 / 4.5	0.2	< 1.0
10	3.2	1.2 / 4.5	2.9	< 1.0
11	2.3	1.2 / 4.5	0.2	< 1.0
12	3.3	1.2 / 4.5	0.1	< 1.0
13	4.3	1.2 / 4.5	0.3	< 1.0
14	3.2	1.2 / 4.5	0.2	< 1.0
15	2.9	1.2 / 4.5	0.1	< 1.0
16	4.7	1.2 / 4.5	0.1	< 1.0

Nel corso della stagione di monta è stato effettuato il dosaggio del testosterone che ha mostrato un picco comune a tutti gli stalloni nel corso del mese di aprile mentre non sono state riscontrate differenze significative una volta che i valori sono stati accorpati in funzione della classe di età e del mese di riferimento.

Tabella 12. Concentrazioni sieriche del testosterone per mese (ng/dl)

STALLONI	TESTOSTERONE MARZO	TESTOSTERONE APRILE	TESTOSTERONE MAGGIO	TESTOSTERONE GIUGNO
1	27	231	52	39
2	52	234	248	133
3	76	246	76	56
4	56	367	141	63
5	52	379	88	175
6	63	288	141	183
7	38	248	77	85
8	50	267	100	40
9	105	257	99	90
10	60	315	100	93
11	73	254	79	140
12	95	303	138	61
13	57	246	66	56
14	38	196	46	49
15	70	371	77	112
16	42	213	53	183

Tabella 13. Concentrazioni del testosterone per mese e classe di età (ng/dl)

CLASSI DI ETA'	TESTOSTERONE MARZO	TESTOSTERONE APRILE	TESTOSTERONE MAGGIO	TESTOSTERONE GIUGNO
≤15	46	249	95	103
16-19	62	320	112	119
≥20	65	268	91	90

## DISCUSSIONI

1. Effetto dei parametri “mese ed anno di prelievo”: valutazione della ripetibilità dei parametri seminali

Nello studio oggetto della tesi di dottorato è stata valutata una “situazione di campo” finalizzata allo studio dei principali parametri riproduttivi dello stallone e alla valutazione della loro attendibilità in un contesto in cui non è possibile disporre di indici di fertilità degli stalloni stessi. Negli ultimi anni uno dei settori di maggior interesse in campo equino è rappresentato dalla ricerca di test affidabili per la predizione della fertilità negli stalloni. L'ipofertilità fisiologica dello stallone rispetto ad altre specie domestiche rischia di andare incontro ad un graduale peggioramento in quanto, oltre ad un notevole inbreeding tipico di alcune razze equine, si osserva una selezione degli stalloni soprattutto per meriti sportivi o genetici piuttosto che per la fertilità dei soggetti<sup>(1)</sup>. Nella maggior parte dei casi infatti vi è la tendenza a non escludere, a fronte di una carriera sportiva di elevato livello, soggetti anche chiaramente ipofertili nella convinzione di poter gestire la carriera riproduttiva del futuro stallone modificando il “book” di cavalle durante la stagione di monta e bypassando le problematiche della fertilità con le più moderne tecniche di riproduzione artificiale. Numerose sono le associazioni di razza ma solo alcune attuano anche

una selezione degli stalloni sulla base delle performance riproduttive<sup>(2)</sup>. Anche in questi casi si tratta tuttavia di una stima della potenziale fertilità che potrà avere un riscontro oggettivo solo con le diagnosi di gravidanza o con le nascite dei puledri. La valutazione della fertilità degli stalloni viene idealmente stabilita mediante il mancato ritorno in calore delle fattrici o, in maniera ancor più oggettiva, mediante la diagnosi di gravidanza delle fattrici a 14-15 giorni dall'ovulazione. È inoltre necessario che lo stallone disponga di un parco fattrici sufficientemente ampio o vario da poter dare valore statistico alle percentuali di gravidanza da esso raggiunte. La maggior parte delle volte tuttavia la fertilità viene determinata soltanto con la nascita dei puledri e la registrazione di questi seppure diversi fattori manageriali o legati alla fattrice possano inficiare il dato<sup>(3-5)</sup>. In centri di produzione di materiale seminale talvolta non viene gestito direttamente il parco fattrici degli stalloni oppure il numero delle richieste per gli stalloni non è sempre sufficiente a permettere una corretta lettura dei dati. Riscontri analoghi si hanno nei grossi centri di produzione del materiale seminale bovino o suino. Inoltre è spesso necessario effettuare valutazioni su più anni per poter avere conferma circa la fertilità degli stalloni e ciò ha come implicazione una valutazione di tipo retrospettivo con notevoli incognite nell'immediato<sup>(6)</sup>. La ricerca effettuata in questo lavoro si è svolta principalmente in un centro di riproduzione equina che presentava questi limiti oggettivi. Tuttavia il numero di stalloni presenti e l'uniformità in termini di

management ha condotto alla possibilità di un'analisi riproduttiva degli stessi. La maggior parte degli stalloni nel corso dei quattro anni sono stati prelevati con notevole regolarità, in particolare durante il periodo aprile-maggio-giugno, con prelievi nelle giornate del lunedì, mercoledì e venerdì determinando un regolare rilascio degli spermatozoi dalle sedi di accumulo extragonadiche. Lo studio ha mostrato la tendenza ad un aumento della concentrazione spermatica e ad un peggioramento delle caratteristiche seminali alle 24 e 48 ore nel gruppo di stalloni in esame. La maggiore concentrazione spermatica in soggetti anziani non trova tuttavia supporto bibliografico in quanto diversi studi hanno evidenziato che il raggiungimento delle concentrazioni massime avvenga in soggetti di età media<sup>(7-10)</sup>. In uno studio di Dowsett e Knott<sup>(11)</sup> gli stalloni di 12-13 anni hanno presentato le concentrazioni più elevate mentre il numero totale degli spermatozoi nell'eiaculato veniva evidenziato in soggetti tra 5 e 13 anni. Nello stesso studio si sottolineava la tendenza ad una diminuzione del volume gel-free dopo aver raggiunto il massimo in soggetti di 9-10 anni. Nello studio oggetto del dottorato di ricerca è stato possibile riscontrare una significativa diminuzione di tale parametro. Visto l'elevato valore economico degli stalloni e la conseguente tendenza a utilizzare, con finalità riproduttive, gli stessi spesso ben al di là della soglia dei 20 anni di età, tale riscontro può alterare la fertilità prevista in un sistema di monta naturale<sup>(12)</sup> piuttosto che di inseminazione artificiale dove minore importanza rivestono i volumi seminali totali e gel-

free<sup>(10,13)</sup>. Il riscontro di una minore qualità del parametro motilità spermatica alle 24 e 48 ore è invece coerente con altri lavori che hanno evidenziato un peggioramento della qualità spermatica nei soggetti anziani<sup>(12)</sup>. Sempre Dowsett e Knott<sup>(11)</sup> hanno sottolineato che potrebbe esserci una età critica alla base della riduzione della qualità seminale dopo i 14 anni di età. Singoli soggetti possono tuttavia conservare più a lungo la propria fertilità come visto in tori di 19 anni di età<sup>(14)</sup> o nel caso della paternità di un uomo di 94 anni<sup>(15)</sup>.

Il presente studio ha riscontrato nel pool di stalloni la tendenza nel corso dei mesi ad un incremento del numero degli spermatozoi e tale aspetto è generalmente accettato visto il ripristino della funzionalità ormonale dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. L' aumentata produzione spermatica potrebbe in tal caso essere giustificata anche dai tempi richiesti dalla spermatogenesi e il successivo rilascio degli spermatozoi facendo così ricadere nella parte conclusiva della stagione di monta parte degli effetti della riattivazione ormonale primaverile. Sul piano ormonale effettivamente si riscontra un particolare trend della concentrazione in circolo del testosterone e di cui si parlerà più avanti.

I parametri seminali dei singoli stalloni hanno mostrato un certo grado di ripetibilità che può essere apprezzato graficamente nell'allegato alla tesi. Tuttavia come sottolineato già da altri autori<sup>(16)</sup> singoli prelievi non sono rappresentativi del potenziale riproduttivo degli stalloni in esame in quanto sono



fortemente influenzati dal periodo di prelievo e dalle caratteristiche individuali. Nel presente studio è stato possibile riscontrare una minore ripetibilità delle caratteristiche seminali alle 24 e 48 ore rispetto alla qualità del materiale seminale al momento del prelievo. Sebbene nello studio il materiale seminale sia stato gestito sempre dallo stesso personale, è tuttavia ipotizzabile che un fattore di gestione del seme possa essere in grado di determinare una certa difformità nelle percentuali dei motili e dei motili progressivi alle 24 e 48 ore piuttosto che in corso di valutazione immediata nel post-prelievo.

## 2. Effetto del fattore “razza” sui parametri seminali

La classificazione per razza ha permesso una comparazione di valore statistico solo tra i soggetti di razza anglo-arabo e sella. Il riscontro di una migliore qualità spermatica dei soggetti anglo-arabi in questo studio necessita tuttavia di ulteriori approfondimenti anche alla luce di una bibliografia piuttosto variegata<sup>(20-22)</sup>. Inoltre i valori ottenuti dagli stalloni sella rientrano nei parametri di razza come visto in diversi studi<sup>(23-25)</sup>. Sebbene Dowsett e Knott<sup>(11)</sup> e Jasko<sup>(26)</sup> abbiano sottolineato che negli stalloni arabi le concentrazioni spermatiche e il numero spermatico totale presentassero valori notevolmente più alti rispetto a quelli di altre razze non è stato possibile effettuare tale valutazione nel presente studio visto il numero esiguo di soggetti appartenenti a tale razza.

## 3. Effetto del fattore “età” sui parametri seminali

Il fatto che stalloni anziani presentino una significativa diminuzione della concentrazione spermatica non sufficientemente bilanciata dal lieve incremento del volume gel-free dal mese di aprile al mese di maggio (aspetto non riscontrato in altre fasce di età) lascia intendere che gli stalloni di questa età, seppur utilizzabili per gli scopi riproduttivi, necessitino di un più ferreo controllo rispetto ad altri stalloni e soprattutto in un ipotetico utilizzo in monta naturale. Tra l'altro gli stessi stalloni hanno mostrato una diminuzione delle concentrazioni spermatiche nel corso delle stagioni di monta aspetto anch'esso da considerare in un contesto di monta naturale con parco fattrici elevato. Nello studio tale convincimento viene esacerbato dai volumi seminali particolarmente ridotti nei soggetti al di sopra dei 20 anni di età. Al riguardo sono stati pubblicati lavori tra loro contrastanti. Gamboa e colleghi<sup>(16)</sup> hanno registrato concentrazioni spermatiche più basse nel periodo maggio-luglio analogamente a Janett e colleghi<sup>(17)</sup> mentre risultati contrastanti sono stati ottenuti da Magistrini e colleghi<sup>(18)</sup> e Hoffmann e Landeck<sup>(19)</sup>. Gli stalloni della classe di età compresa tra 16 e 19 anni, già classificabili in fase senile sulla base della bibliografia inerente, sono stati quelli con la migliore qualità del materiale seminale considerando i parametri spermatozoi motili e spermatozoi progressivamente motili alle 0, 24 e 48 ore e ciò evidenzia quanto gli stalloni possano prolungare la loro attività riproduttiva seppure con gli accorgimenti visti precedentemente.

#### 4. Valutazione della morfologia spermatica

L'analisi morfologica del materiale seminale ha evidenziato un notevole effetto delle caratteristiche individuali con un certo grado di ripetibilità dei principali difetti spermatici presenti. Tuttavia non si è a disposizione di un sistema di classificazione che permetta di correlare in maniera chiara i difetti spermatici con la fertilità e ciò accentua l'importanza di una corretta valutazione delle singole anomalie affiancata dall'intero esame clinico del soggetto<sup>(27)</sup>. Nel presente studio è stata evidenziata la tendenza ad un peggioramento delle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi che comunque si sono rivelate accettabili in tutte le classi di età sulla base dei criteri utilizzati in precedenti studi<sup>(28-32)</sup>. Il riscontro di uno stallone con un elevato numero di spermatozoi con difetti del pezzo intermedio, associato ad una motilità spermatica nella norma a 0 ore dal prelievo e particolarmente scadente alle 24 e 48 ore ha avvalorato il pensiero corrente secondo cui sia necessaria una valutazione della morfologia prima di tutto su base individuale piuttosto che per classi di età o razza<sup>(27)</sup>. Lo stallone sarà oggetto di una più approfondita valutazione. L'esame della morfologia spermatica ha inoltre permesso di confermare su singoli soggetti i dubbi già espressi sulla qualità del loro materiale seminale. In particolare il riscontro di un elevato numero di spermatozoi con gocce citoplasmatiche prossimali è stato, in diversi studi su tori<sup>(33)</sup> e stalloni<sup>(32,34)</sup>, associato ad una diminuzione della fertilità e viene riportato che valori anche solamente del 10%

sono in grado di alterarla. Nel presente studio è stato evidenziato un numero elevato di spermatozoi con gocce citoplasmatiche prossimali in tre soggetti: in due casi si è trattato di stalloni con qualità del materiale seminale particolarmente scadente mentre nel caso del terzo stallone tale riscontro si affiancava a valori dei parametri seminali mediamente buoni. Lo stallone tuttavia ha 26 anni e ciò conferma quanto già affermato circa l'attendibilità dei valori del materiale seminale in relazione alla possibilità di predire l'effettiva fertilità dello stallone. Perciò, seppure la valutazione della morfologia spermatica non consenta di effettuare una prognosi certa della fertilità dei soggetti è tuttavia d'ausilio stimolando alla valutazione più approfondita di determinati stalloni e ponendo il sospetto di ipofertilità<sup>(35,36)</sup>.

##### 5. Valutazione delle dimensioni testicolari e dei parametri dell'arteria testicolare

La valutazione dei parametri dell'arteria testicolare è stato oggetto di esame al fine di approfondirne l'eventuale impiego clinico in presenza di casi clinici di sospetta ipofertilità. In medicina umana l'esame testicolare mediante eco-color-doppler, pulsed-wave e power-doppler viene effettuato di routine per la valutazione dello stato andrologico<sup>(37,38)</sup> in quanto va a rappresentare il metodo più semplice per la misurazione del flusso ematico mediante la combinazione dei diversi parametri delle dinamiche di flusso<sup>(39)</sup>. In medicina umana è stato

riportato che la valutazione del flusso ematico testicolare è capace di predire la funzionalità testicolare e quindi la spermatogenesi<sup>(40)</sup>, utile inoltre nel differenziare i vari casi di dispermia<sup>(39,41)</sup>. Inoltre Herwig e collaboratori<sup>(42)</sup> hanno dimostrato che la quantità e qualità spermatica dipenda dal grado di perfusione del parenchima testicolare. La riduzione del flusso sanguigno è in grado di determinare un danno ischemico che conduce a un deterioramento della spermatogenesi. È stato riportato che la parziale restrizione dell'arteria testicolare influisce negativamente su crescita, volume e struttura istologica dei testicoli di toro causando il completo o parziale arresto della spermatogenesi<sup>(43)</sup>. Nel presente studio sono stati valutati i principali parametri dell'arteria testicolare a livello della parte convoluta dell'arteria. Il riscontro di una significativa differenza ( $P < 0.05$ ) nella frequenza del flusso arterioso totale seppure solo dell'arteria testicolare destra tra stalloni  $\leq 15$  e stalloni  $\geq 20$  va considerato un aspetto molto importante della discussione dei dati. Infatti la frequenza di TABF viene considerata il miglior parametro della perfusione dell'organo<sup>(44)</sup>. Tale parametro nell'uomo è notevolmente influenzato dal varicocele<sup>(44)</sup>. Inoltre come visto da altri autori, alterazioni dei valori della frequenza di TABF potrebbero fungere da segnali precoci di patologie testicolari associate ad alterazioni vascolari in grado di influire sulla funzione testicolare e sul suo volume<sup>(45)</sup>. Lo studio delle caratteristiche dell'arteria testicolare ha anche permesso di evidenziare valori significativamente più elevati per l'indice di

resistività nei soggetti anziani rispetto ai giovani. Tale riscontro trova conferma in bibliografia in quanto uno studio di Pozor e McDonnell<sup>(46)</sup> evidenziava che i soggetti più anziani presentavano valori inferiori di EDV e maggiori per RI rispetto agli stalloni di mezza età (11-15 anni) nella parte convoluta dell'arteria testicolare. Analoghi riscontri si hanno in medicina umana dove è stato dimostrato che i valori della RI erano inferiori nei ragazzi prepuberi rispetto ai puberi ed aumentavano negli anziani<sup>(47,48)</sup>. Sempre in campo umano è stato inoltre ipotizzato che volumi testicolari maggiori siano associati ad una RI inferiore<sup>(48)</sup>. Un altro studio ha suggerito che la RI, così come i valori di PSV, rappresentino validi indicatori di produzione spermatica essendo questi parametri fortemente correlati con il punteggio della frequenza di produzione spermatica<sup>(41)</sup>. In un recente studio di Zelli e colleghi<sup>(49)</sup> sono state valutate le possibili correlazioni tra le caratteristiche seminali canine ed il flusso dell'arteria testicolare. È stato in particolare notato che i parametri RI e PI presentavano una correlazione negativa con la motilità totale e progressiva ai tempi T0, T24, T48 e T72. Gli autori hanno attribuito tale correlazione negativa alla diminuita concentrazione e diminuito apporto energetico di nucleotidi dell'adenina. Ciò determinerebbe una conseguente alterazione della spermatogenesi secondaria al difettoso metabolismo energetico a livello mitocondriale. Gli autori concludevano affermando che fosse possibile speculare che, essendo RI e PI correlate negativamente con la perfusione ematica, più questi indici erano bassi

e più la spermatogenesi era efficiente da un punto di vista qualitativo<sup>(49)</sup>. Uno degli obiettivi del presente studio è dato dalla valutazione di eventuali correlazioni tra i parametri dell'arteria testicolare e quelli seminali. Tali valutazioni sono in fase di analisi.

I risultati ottenuti sugli altri parametri dell'arteria testicolare nell'attività di ricerca del presente studio potrebbero non aver mostrato una significatività statistica per via dell'età dei soggetti nelle varie classi di età. Nello studio infatti gli stalloni della classe di età  $\leq 15$  sono comunque stalloni maturi seppur molto più giovani rispetto a quelli delle altre due classi di età. Le differenze nei parametri dell'arteria testicolare potrebbero quindi essere più marcate laddove si ampliasse il numero dei soggetti per classe di età o utilizzando stalloni particolarmente giovani. Nello studio è stato anche possibile valutare le caratteristiche dell'onda di flusso ematico testicolare e i riscontri ottenuti sono in linea con le pubblicazioni precedenti. In particolare è stato osservato un marcato aumento della resistività in relazione all'età degli stalloni, aspetto che presenta la giustificazione nei differenti valori dell'indice di resistività nei vari gruppi di età. In altri studi è stato visto che la RI era più utile nel differenziare profili dell'onda arteriosa anomali risultando essere solitamente alterata in corso di processi infiammatori<sup>(50)</sup> o, appunto, con l'avanzare dell'età<sup>(47)</sup>. Le caratteristiche dell'onda doppler sono state valutate in diverse specie: nell'uomo e nel cane l'onda presenta un carattere “non resistivo”<sup>(51-53)</sup> mentre nel cavallo è per lo più

“resistiva” a livello del cordone spermatico mentre nell’aspetto marginale dell’arteria testicolare principalmente “non resistiva”<sup>(46)</sup>. La marcata resistività osservata nel presente studio conduce a ragionare sui possibili effetti sulla spermatogenesi e, di conseguenza, sulle caratteristiche seminali degli stalloni. Il testicolo presenta infatti una elevata richiesta metabolica in particolare per quanto concerne i tubuli seminiferi che sono esposti a particolari condizioni di bassa pressione e tensione dell’ossigeno. Tale richiesta metabolica viene assicurata dalla vascolarizzazione che, in condizioni normali, è capace di supportare il testicolo con quantità sufficienti di nutrienti ed ossigeno<sup>(54)</sup> Tuttavia condizioni patologiche in grado di alterare la perfusione tissutale sono in grado di determinare un malfunzionamento testicolare come visto in diversi studi<sup>(55,56)</sup>.

## 6. Quadro ormonale degli stalloni oggetto dello studio

Uno degli obiettivi dello studio è stato quello di valutare l’effetto delle alterazioni dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene sull’apparato riproduttore. Gli effetti deleteri del cortisolo sulla spermatogenesi sono stati infatti dimostrati direttamente nei tori mediante trattamento con corticosteroidi<sup>(57)</sup>. Analoghi riscontri si sono avuti nell’uomo e nei roditori: nelle due specie infatti elevati livelli ematici di cortisonici sono in grado di alterare le caratteristiche seminali<sup>(58)</sup>. Oltre alle caratteristiche seminali gli alti livelli di cortisonici sono,



nell'uomo, in grado di determinare un calo dei livelli di androgeni in corso di sindrome di Cushing o somministrazione di glucocorticoidi<sup>(59)</sup>. In particolare uomini che ricevevano 30 mg di prednisolone per 30 giorni mostravano un calo del numero degli spermatozoi che passavano da una valutazione iniziale tra 42 e 56,4 milioni di spermatozoi per ml ad una conclusiva inferiore a 10 milioni per ml a seguito di trattamento. Nello stesso studio si riscontrava una alterazione anche della motilità spermatica: all'inizio dell'esperimento era dell'80-90% mentre alla conclusione si attestava intorno al 20%.

Nello stallone non risultano lavori che facciano riferimento all'effetto della PPID sui parametri seminali e ormonali nello stallone ma in uno studio di Janett e colleghi<sup>(33)</sup> proprio su stalloni veniva evidenziato che un esercizio fisico ripetuto in maniera estenuante per un periodo di 4 settimane era in grado di determinare aumentate concentrazioni di cortisolo in circolo: 3 settimane dopo l'inizio del periodo di esercizio si riscontrava un'aumentata produzione di spermatozoi anomali. Come sottolineato già nei Risultati, il numero ridotto di stalloni con parametri ormonali alterati non ha consentito di approfondire l'effetto di tali scompensi sulle caratteristiche seminali degli stessi stalloni. Uno studio di Johnson e colleghi<sup>(61)</sup> ha evidenziato come nei cavalli i glucocorticoidi agiscano sulla perfusione tissutale mediante un'azione diretta sulla muscolatura liscia vascolare. Tale effetto trova riscontro in un incremento dell'indice di resistività dei vasi<sup>(61)</sup>. Nel corso degli ultimi anni nei cavalli sono stati effettuati

numerosi studi<sup>(60-62)</sup> sull'effetto dell'ipercortisolismo in corso di PPID su forme idiopatiche di laminite. Inoltre è stato possibile evidenziare che betametasone ed idrocortisone potenziano le azioni vasocostrittrici delle catecolamine epinefrina, norepinefrina e serotonina sui grossi vasi digitali<sup>(60)</sup>. Johnson e colleghi<sup>(62)</sup>, in particolare, ritengono che il desametasone ed il triamcinolone agiscano sulle cellule della muscolatura liscia vascolare determinando un incremento della contrattilità e, potenzialmente, contribuendo a una condizione di ridotto flusso ematico. Tali concetti di fisiopatologia, accompagnati dal riscontro di un aumento dell'indice di resistività nei soggetti patologici, trova nel presente lavoro il riscontro in uno degli stalloni con elevata concentrazione basale in circolo dell'ormone ACTH. Tra i 14 stalloni oggetto della valutazione dei parametri dell'arteria testicolare lo stallone in esame ha presentato l'indice di resistività più elevato per quanto concerne l'arteria testicolare sinistra mentre il secondo valore più alto in relazione a quella di destra.

La valutazione del testosterone è stata pensata come uno screening utile per l'analisi del trend nei vari stalloni e nei gruppi di età. I risultati ottenuti si sono rivelati in linea con precedenti studi che già avevano valutato le concentrazioni dell'ormone nel sangue periferico durante il corso dell'anno o su periodi di tempo più ristretti<sup>(63-69)</sup>. Dato rilevante è rappresentato dalla elevata produzione ormonale anche in stalloni anziani aspetto che limita l'utilizzo del dosaggio basale dell'ormone con finalità diagnostiche. È stato riscontrato che il

testosterone è forse l'ultimo ormone a subire un calo delle concentrazioni plasmatiche in corso di alterazioni ormonali o stati di degenerazione testicolare<sup>(70,71)</sup> per cui è possibile una adeguata concentrazione ormonale in circolo in stalloni anche marcatamente ipofertili come, nel presente studio, l'esempio dello stallone "9".

1. van Buiten J., van den Broek Y.H., Schukken B. and Colenbrander B. Validation of non-return rate as a parameter for stallion fertility. *Livestock Production Science* 60, 1999, pp. 13–19.
2. Parlevliet J.M., Kemp B. and Colenbrander B.C. 1994: Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallion. *J Reprod Fert* 101, 183–187.
3. Sullivan J.J., Turner P.C., Self L.C., Gutteridge H.B. and Bartlett D.E. Survey of reproductive efficiency in the quarterhorse and thoroughbred. *J Reprod Fertil Suppl* 23, 1975, pp. 315–318.
4. van Buiten A., Remmen J.L.A.M. and Colenbrander B. Fertility of Shetland pony stallions used in different breeding systems: a retrospective study. *Vet Quart* 20, 1998, pp. 100–103.
5. Morris L.H.A. and Allen W.R. Reproductive efficiency of intensively managed thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Vet J* 34, 2002, pp. 51–60.
6. Rousset H., Chanteloub P., Magistrini M. and Palmer E. 1987. Assessment of fertility and semen evaluations of stallions. *J. Reprod. Fert.. Suppl.*, 35: 25-31.
7. Squires E.L., Pickett B.W. and Amann R.P. Effect of successive ejaculation on stallion seminal characteristics. *J Reprod Fertil Suppl* 1979;27:1-6.
8. Hendrikse J. Het sperma van normaal bevruchtende dekhengsten. The sperm of normally fecundating stallions. *Tijdschr Diergeneesk Deel* 91 1966; afl 5:300-313.
9. Skinner E.L. and Bowen J. Puberty in the Welsh stallion. *J Reprod Fertil* 1968; 16:133-135.

10. Voss J.L., Squires E.L., Pickett B.W. and Amann R.P. Factors affecting reproductive performance of the stallion. Proc 25th Amer Assoc Equine Pratt 1979; 33-49.
11. Dowsett K.F. and Knott L.M. The influence of age and breed on stallion semen. Theriogenology 1996;46:397-412.
12. Dowsett K.F. and Pattie W.A. Characteristics and fertility of stallion semen. J Reprod Fert 1982; 32 (Suppl):1-8.
13. Pickett B.W., Faulkner L.C., Seidel G.E.Jr, Berndtson W.E. and Voss J.L. Reproductive physiology of the stallion. VI. Seminal and behavioral characteristics. J Anim Sci 1976;43:617-25.
14. Najjar A., Benaoun B., Ezzaouia M., Ben Maâtoug A., Magistrini M. and Ben Mrad M. Determination of Semen and Sexual Behavior Parameters of Arabian Stallions to Be Selected for an Artificial Insemination Program under Tunisian Conditions. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 8 (2): 173-177, 2010.
15. Tibary A., Bakkoury M., Anouassi A. and Sghiri A. 2005. Examen et évaluation de l'aptitude à la reproduction. In: Manuels Scientifiques et Techniques. Reproduction Equine. Tome II : l'étalon. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, editor. pp: 39-184.
16. Gamboa S., Rodrigues A.S., Henriques L., Batista C. and Ramalho-Santos J. Seasonal functional relevance of sperm characteristics in equine spermatozoa. Theriogenology 73 (2010) 950–958.
17. Janett F., Thun R., Niedere K., Burger D. and Hassig M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. Theriogenology 2003;60:446–53.
18. Magistrini M., Chanteloube P.H. and Palmer E. Influence of season and frequency of ejaculation on production of stallion semen for freezing. J Reprod Fert Suppl 1987;35:127-33.
19. Hoffmann B. and Landeck A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. Anim Reprod Sci 1999;57:89–98.

20. Hendrikse J. Het sperma van normaal bevruchtende dekhengsten. The sperm of normally fecundating stallions. Tijdschr Diergeneesk Deel 91 1966; afl 5:300-313.
21. Nishikawa Y. and Waide Y. On artificial insemination in the horse. V. On the properties of semen and the factors affecting them. Bull Nat Inst Agric Sci (Ser G) 1951; Nol:13-28.
22. Nishikawa Y. Studies on reproduction in horses. Singularity and artificial control in reproductive phenomena. Japan Racing Association, Shiba Tamuracho Minatoku, Tokyo, Japan, 1959; 206-276.
23. Bielanski W. Characteristics of the semen of stallions. Macro- and microscopic investigations with estimation of fertility. Mem Acad Pol Sci 1950; 16:1-58.
24. Pickett B.W. and Voss J.L. Reproductive management of the stallion. Colorado State University, Experiment Station in cooperation with Animal Reproduction Laboratory. 1973; General Series 934:501-531.
25. Pickett B.W. Collection and evaluation of stallion semen. Proc 2nd Tech Conf Artif Insem Reprod 1968; 80-87.
26. Jasko, D.J. 1992. Evaluation of stallion semen. Veterinary Clinics of North America, Equine Practice, 8(1): 129-147.
27. Brito L.F.C. Evaluation of Stallion Sperm Morphology. Clinical Techniques in Equine Practice 6:249-264, 2007.
28. Card C. Cellular associations and the differential spermogram: making sense of stallion spermatozoal morphology. Theriogenology 64:558-567, 2005.
29. Dowsett K.F. and Knott L.M. The influence of age and breed on stallion semen. Theriogenology 46:397-412, 1996.
30. Dowsett K.F., Osborne H.G. and Pattie W.A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. Theriogenology 22:463-472, 1984.

31. Love C.C., Varner D.D. and Thompson J.A. Intra and inter-stallion variation in sperm morphology and their relationship with fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 56:93-100, 2000.
32. Jasko D.J., Lein D.H. and Foote R.H. Determination of the relationship between sperm morphologic classifications and fertility in stallions: 66 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc* 197:389-394, 1990.
33. Janett F., Burkhardt C., Burger D. et al. Influence of repeated treadmill exercise on quality and freezability of stallion semen. *Theriogenology* 65:1737-1749, 2006.
34. Pesch S., Bostedt H., Failing K. et al. Advanced fertility diagnosis in stallion semen using transmission electron microscopy. *Anim Reprod Sci* 91:285-298, 2006.
35. Clément F., Vidament M. and Magistrini M. 1992. Estimation du pouvoir fécondant de l'étalon. *Rec. Méd. Vét.*, 168(11/12): 947-957.
36. Brito L.F.C. 2007. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin. Tech. Equine Pract.*, 6: 249-264.
37. Middleton W.D., Thorne D.A. and Melson G.L. 1989. Color Doppler ultrasound of the normal testis. *American Journal of Roentgenology* 152, 293–297.
38. Dubinsky T., Chen P. and Maklad, N. 1998. Color-flow and power Doppler imaging of the testes. *World Journal of Urology* 16, 35–40.
39. Atilla M.K., Sargin H., Yilmaz Y., Odabas Ö., Keskin A. and Aydin S. 1997. Undescended testes in adults: clinical significance of resistive index values of the testicular artery measured by Doppler ultrasound as a predictor of testicular histology. *Journal of Urology* 158, 841–843.
40. Pinggera G.M., Mitterberger M., Bartsch G., Strasser H., Gradl J., Aigner F., Pallowein L. and Frauscher F. 2008. Assessment of the intratesticular resistive index by colour Doppler ultrasonography

- measurements as a predictor of spermatogenesis. *British Journal of Urology International* 101, 722–726.
41. Biagiotti G, Cavallini G, Modenini G, Vitali G and Gianoroli L. Spermatogenesis and spectral echo-colour Doppler traces from the main testicular artery. *BJU Int* 2002;90:903–8.
  42. Herwig R., Tosun K., Pinggera G.M., Soelder E., Moeller K.T., Pallwein L., Frauscher E., Bartsch G., Wildt L. and Illmensee K., 2004. Tissue perfusion essential for spermatogenesis and outcome of testicular sperm extraction (TESE) for assisted reproduction. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 21, 175–180.
  43. Kay G.W., Grobbelaar J.A., Hattingh J. 1992. Effect of surgical restriction of growth of the testicular artery on testis size and histology in bulls. *Journal of Reproduction and Fertility* 96, 549–553.
  44. Tarhan S., Gumus B., Gunduz I. et al. Effect of varicocele on testicular artery blood flow in men: color Doppler investigation. *Scand J Urol Nephrol* 37:38-42, 2003.
  45. Pozor M.A. Evaluation of testicular vasculature in stallions. *Clin Tech Equine Pract* 6:271-277, 2007.
  46. Pozor M.A. and McDonnell S.M. Color Doppler ultrasound evaluation of testicular blood flow in stallions. *Theriogenology* 61 (2004) 799–810.
  47. Wielgos M., Bablok L., Fracki S. and Marianowski L. Doppler flow measurements in testicular artery of aging males. *Gin Pol* 1998;69(6):537–40.
  48. Paltiel H.J., Rupich R.C. and Babcock D. Maturation changes in arterial impedance of the normal testis in boys: Doppler sonographic study. *AJR* 1994;163:1189–93.
  49. Zelli R., Troisi A., Elad Ngonput A., Cardinali L. and Polisca A. Evaluation of testicular artery blood flow by Doppler ultrasonography as a predictor of spermatogenesis in the dog. *Research in Veterinary Science* 95 (2013) 632–637.

50. Jee W.H., Choe J.K., Byun J.Y., Shinn K.S. and Hwang T.K. Resistive index of the intrascrotal artery in scrotal inflammatory disease. *Acta Radiol* 1997;38:1026–30.
51. Middleton W.D., Thorne D.A. and Melson G.L. Color Doppler ultrasound of the normal testis. *Am J Radiol* 1989;152:293–7.
52. Gunzel A.R., Mohrke C. and Poulsen Nautrup C. Colour-coded and pulsed Doppler sonography of the canine testis, epididymis and prostate gland: physiological and pathological findings. *Reprod Dom Anim* 2001;36:236–40.
53. Gumbsch P., Gabler C. and Holzmann A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. *Vet Rec* 2002; 151:140–4.
54. Bergh A., Collin O. and Lissbrant E. 2001. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. *Biology of Reproduction* 64, 13–20.
55. Bergh, A. and Damber, J.E. 1993. Vascular controls in testicular physiology. In: de Kretser, D.M. (Ed.), *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. Academic Press, New York, pp. 439–468.
56. Damber, J.E. and Bergh A. 1992. Testicular microcirculation a forgotten essential in andrology. *International Journal of Andrology* 15, 285–292.
57. Barth A.D. and Bowman P.A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. *Can Vet J* 35:93-102, 1994.
58. Mancini R.E., Lavieri J.C., Muller F. et al. The effect of prednisolone upon normal and pathologic human spermatogenesis. *Fertil Steril* 17500, 1966.
59. Baker H.W. Reproductive effects of nontesticular illness. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1998; 27:831–50.



60. Eyre P., Elmes P.J. and Strickland S. Corticosteroid-potentiated vascular responses of the equine digit: A possible pharmacologic basis for laminitis. *Am J Vet Res* 40:135-138, 1979
61. Johnson P.J., Messer N.T., Slight S.H., Wiedmeyer C., Buff P. and Ganjam V.K. Endocrinopathic Laminitis in the Horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, Vol 3, 2004, pp. 45-56.
62. Johnson P.J., Bowles D.K. and Messer N.T. Dexamethasone alters equine digital artery smooth muscle ion channel activity and contractility: Role in glucocorticoid-associated laminitis? *J Vet Int Med* 17:457-458, 2003.
63. Amann R.P. and Ganjam V.K. Effect of hemicastration or hCG-treatment on steroids in testicular vein and jugular vein blood of stallions. *J Androl* 2:132-139, 1981.
64. Seamans M.C. et al. Gonadotrophin and steroid concentrations in jugular and testicular venous plasma in stallions before and after GnRH injection. *J Reprod Fertil Suppl* 44:57-67, 1991.
65. Berndtson W.E., Pickett B.W. and Nett T.M. Reproductive physiology of the stallion. IV. Seasonal changes in the testosterone concentration of peripheral plasma. *J Reprod Fertil* 1974; 39:115-118.
66. Wiesner, L.M. and J.F. Kirkpatrick. 1975. Seasonal and diurnal testosterone in wild stallions. *Proc. Eighth Annu. Meet. Soc. Study Reprod.* p. 93.
67. Lang A.L., Vogelsang M.M., Potter G.D., Blanchard T.L. and Harms P.G. Semen parameters and hormone concentrations in stallions subjected to long-term estrogen administration. *Journal Of Equine Veterinary Science*, Volume 18, Number 2, 1998.
68. Hoffmann B. and Landeck A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. *Animal Reproduction Science* 57, pp. 89–98, 1999.
69. Veronesi M.C., Tosi U., Villani M., Govoni N., Faustini M., Kindahl H., Madej A. and Carluccio A. Oxytocin, vasopressin,

prostaglandin F2a, luteinizing hormone, testosterone, estrone sulfate, and cortisol plasma concentrations after sexual stimulation in stallions. *Theriogenology* 73 (2010) 460–467.

70. Douglas R.H. and Umphenour N. Endocrine abnormalities and hormonal therapy. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1992;8:237-49.
71. Roser J.F. and Hughes J.P. Seasonal effects on seminal quality, plasma hormone concentrations and GnRH-induced LH response in fertile and subfertile stallions. *J Androl* 1992;13:214-23.

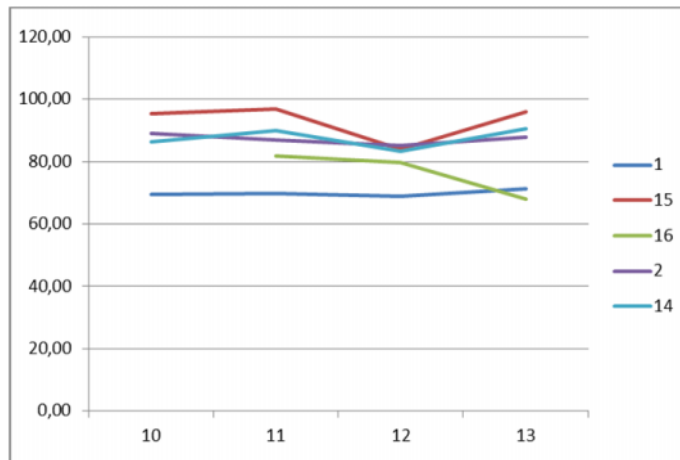
## CONCLUSIONI

Lo studio ha riscontrato un certo grado di ripetibilità delle caratteristiche seminali degli stalloni esaminati e tale aspetto, valutato nel corso di 4 annate consecutive, potrebbe essere attribuito al management aziendale che pone lo stallone nelle condizioni ideali per esprimere al meglio il proprio potenziale riproduttivo. In tali condizioni è possibile che sia il fattore razza sia il fattore età vadano ad interferire in misura minore sulle caratteristiche riproduttive dei soggetti. Tali constatazioni rientrano in una ottimale gestione dello stallone giovane ma mostrano tutta la loro importanza in condizioni di criticità come nel caso degli stalloni anziani ipofertili. L'ipofertilità dello stallone ha storicamente ricevuto una scarsa attenzione e solo nel corso degli ultimi anni è divenuto un tema speculativo di particolare interesse. La valutazione degli stalloni non può trascendere da un esame individuale degli animali ma al tempo stesso è necessaria un riscontro oggettivo mediante tecniche diagnostiche innovative. In tale quadro andrebbe ad inserirsi una più esaustiva comprensione degli effetti degli squilibri ormonali sull'asse riproduttivo e potrebbe essere interessante, in un successivo lavoro, effettuare uno screening ormonale su un numero superiore di stalloni in maniera tale da poter individuare una popolazione consistente di soggetti con alterazioni dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene. In tal caso sarebbe possibile comparare i soggetti con una condizione di PPID subclinica con un gruppo di stalloni della stessa età ma privi di squilibri ormonali. Anche le

interessanti scenari in campo andrologico essendo tale tecnica ormai routinaria nelle diagnosi di fertilità in campo umano.

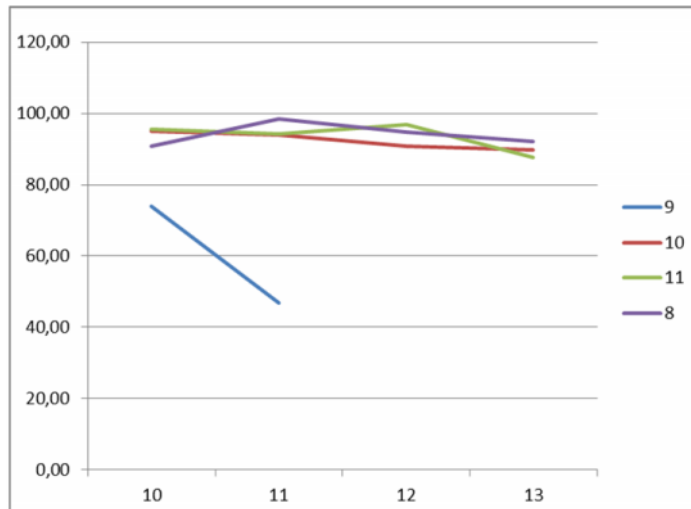
# Motilità per classe di età

% Motili



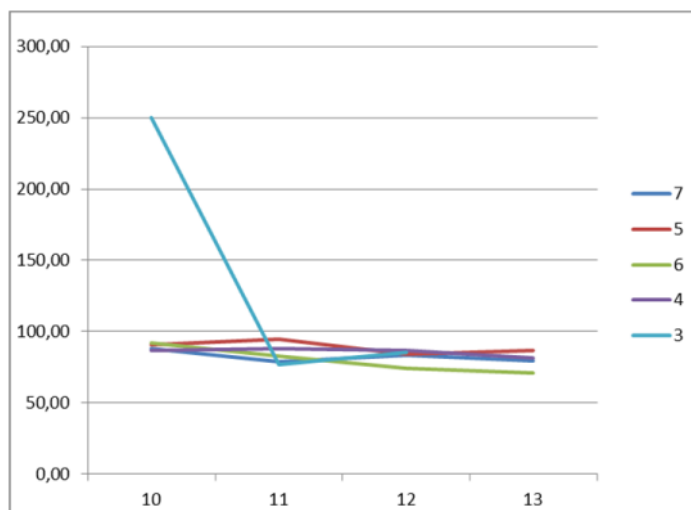
Stagioni di monta

% Motili



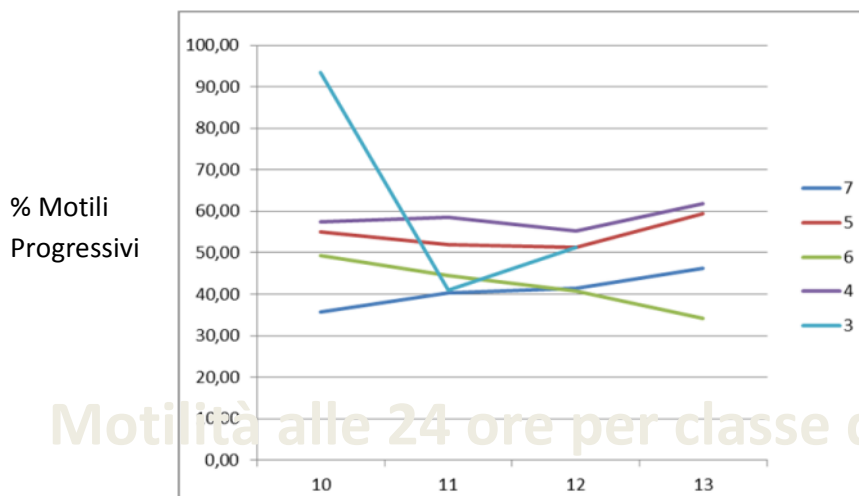
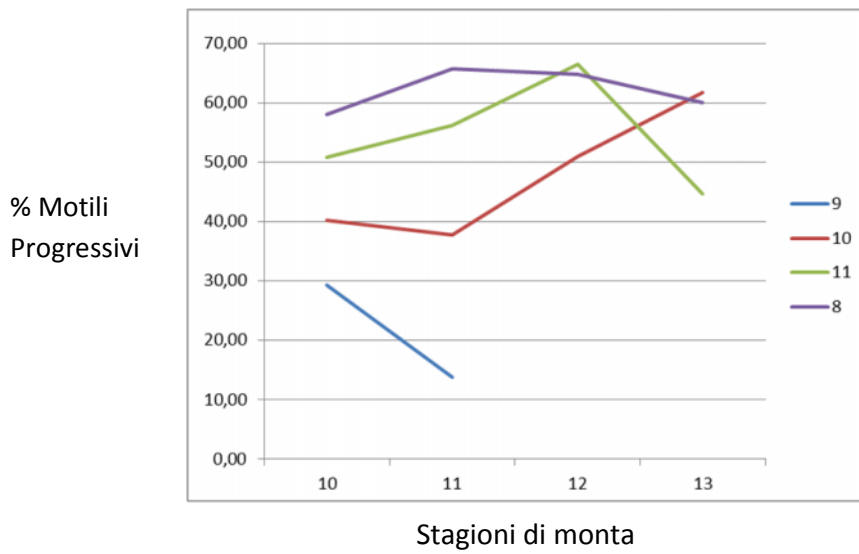
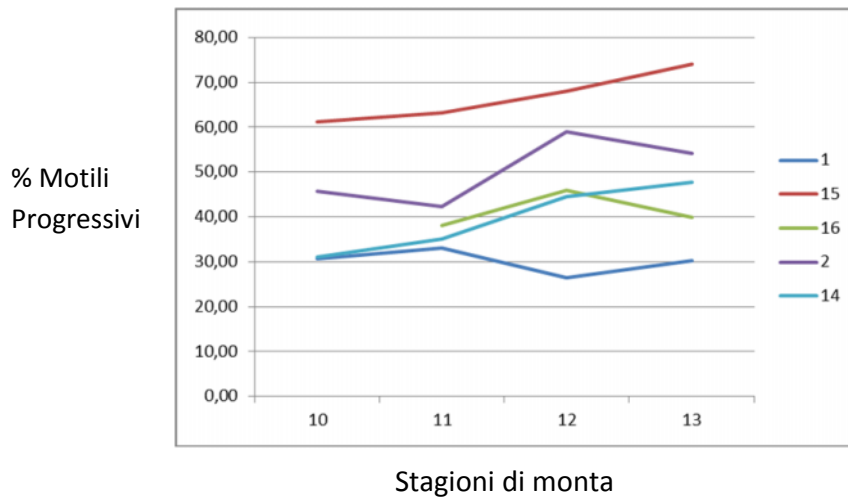
Stagioni di monta

% Motili



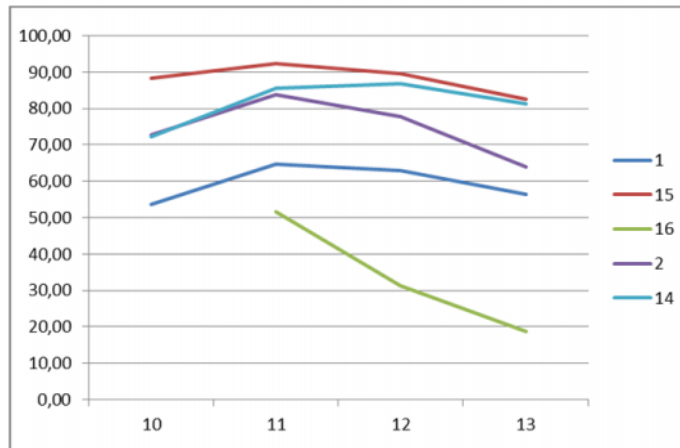
Stagioni di monta

# Motilità progressiva per classe di età



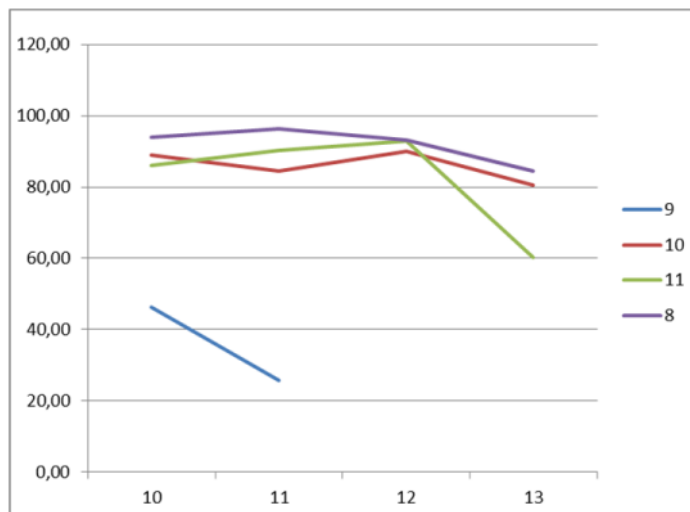
# Motilità alle 24 ore per classe di età

Motili 24 HH



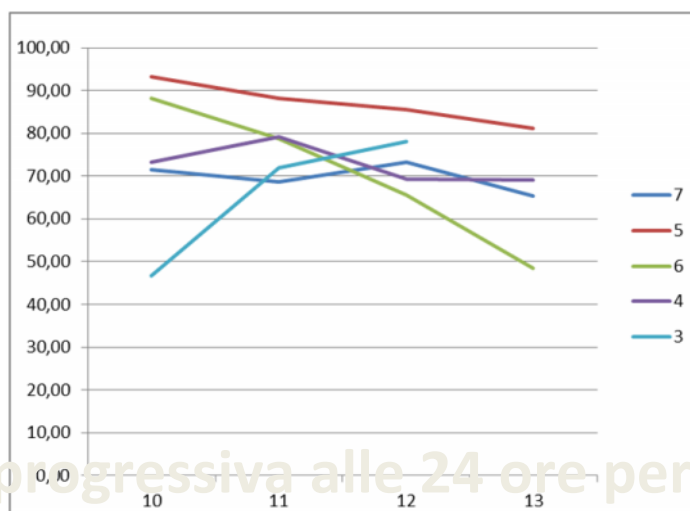
Stagioni di monta

Motili 24 HH



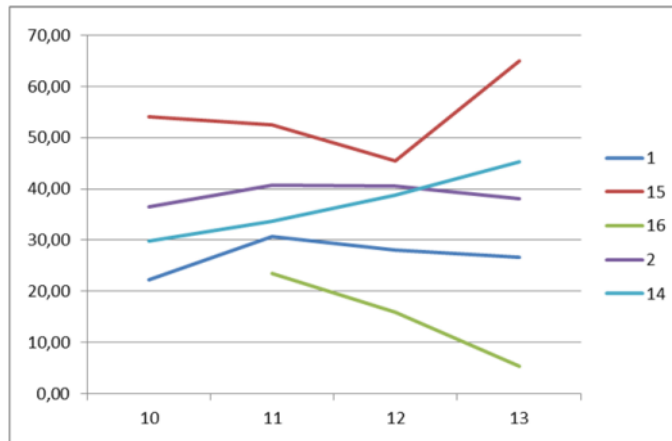
Stagioni di monta

Motili 24 HH



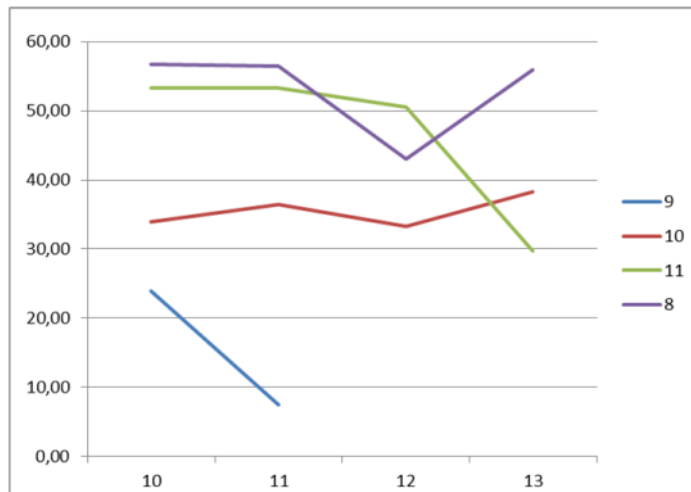
Motilità progressiva alle 24 ore per classe di età

%Motili progressivi  
24 HH



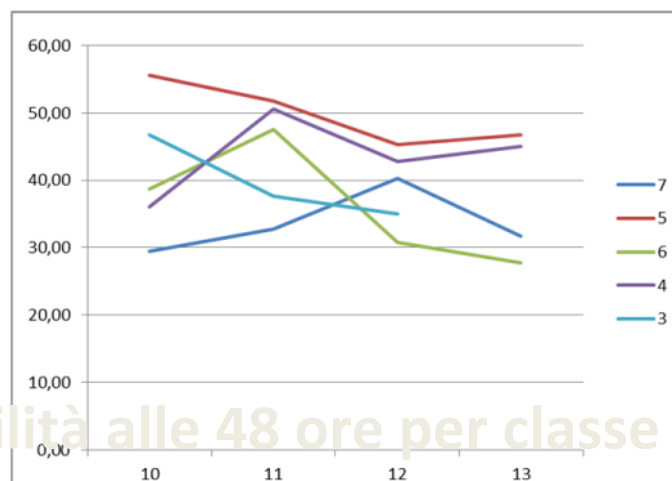
Stagioni di monta

%Motili progressivi  
24 HH



Stagioni di monta

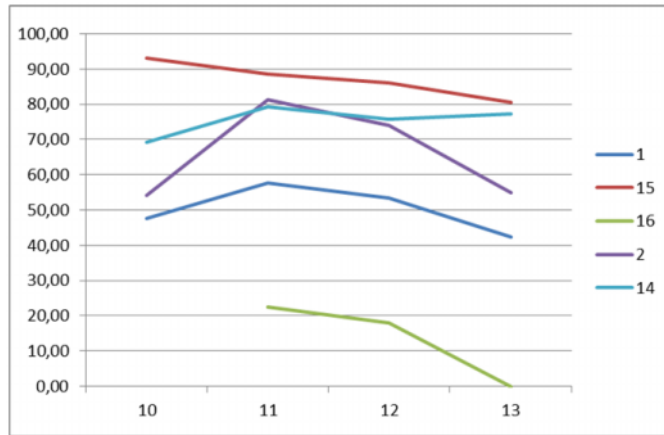
%Motili progressivi  
24 HH



Motilità alle 48 ore per classe di età

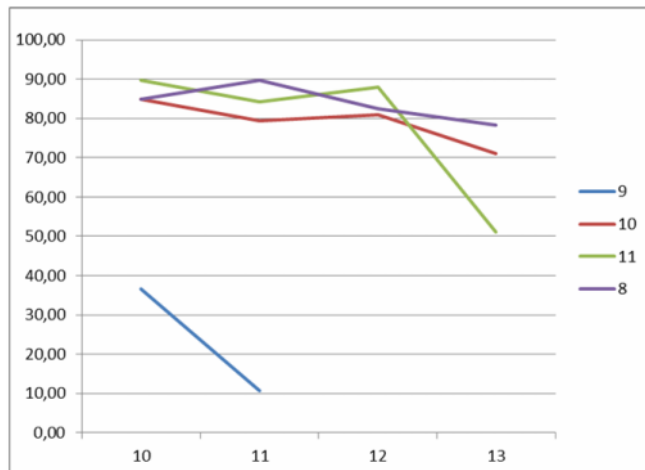


Motili 48 HH



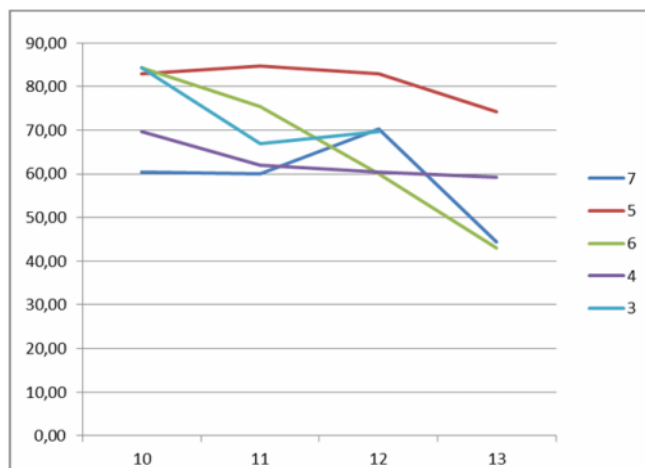
Stagioni di monta

Motili 48 HH



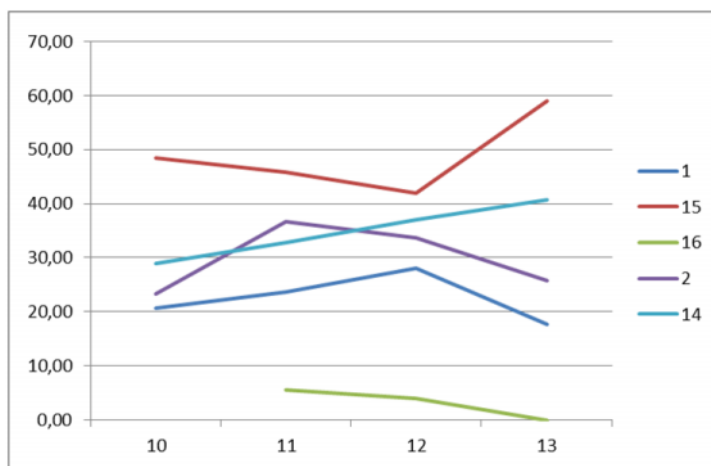
Stagioni di monta

Motili 48 HH



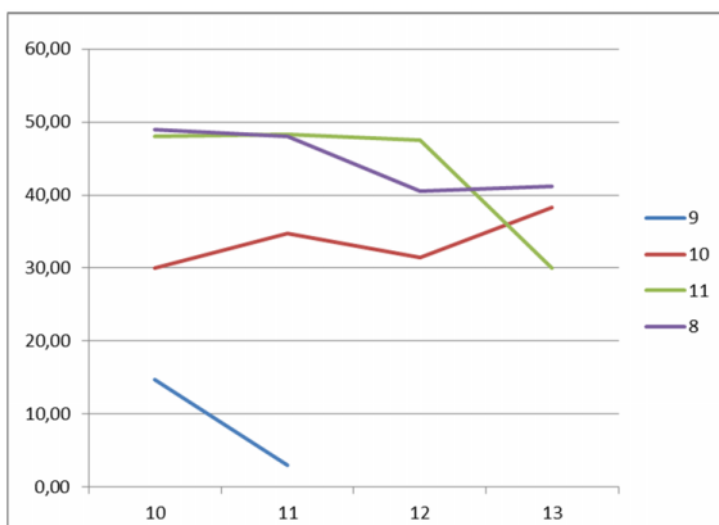
Motilità progressiva alle Stagioni di monta per classe di età

%Motili progressivi  
48 HH



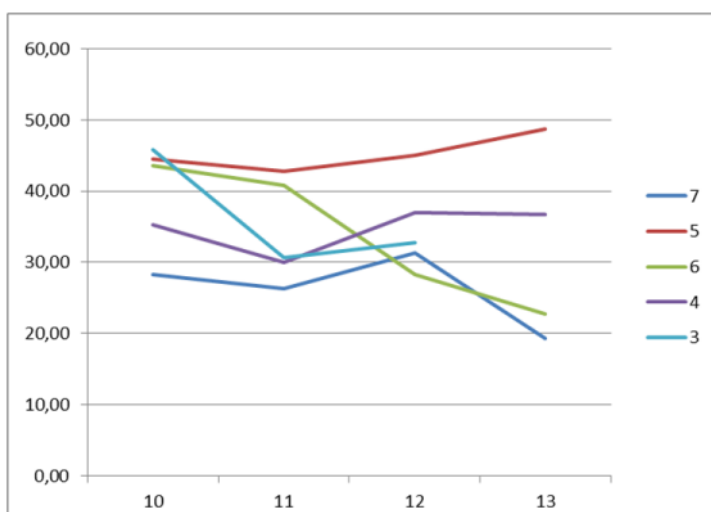
Stagioni di monta

%Motili progressivi  
48 HH



Stagioni di monta

%Motili progressivi  
48 HH



Stagioni di monta

STALLON	DATA	NORVALE	GOCOA		GOCOA		RIPIEGAMENTO COLLO	RIPIEGAMENTO PEZZO INTERMEDIO	AVVOLGIMENTO PEZZO PRINCIPALE	RIPIEGAMENTO PEZZO TERMINALE	TERATOIDE	TESTA STACCATA	APIASIA PEZZO INTERMEDIO	DOPPIA TESTA
			OTOPLASMICA PROX	PSEUDOGOCOA	OTOPLASMICA DISTALE									
1	13/02/2013	121	6	/	10	/	40	/	10	/	12	14	2	
	30/05/2013	139	4	/	14	2	20	/	6	/	4	6	/	
2	13/02/2013	167	6	/	4	/	6	2	6	/	6	/	/	
	30/05/2013	161	12	2	/	2	4	2	15	/	4	/	/	
3	13/02/2013	171	6	2	4	/	/	/	9	/	7	/	/	
	30/05/2013	176	/	/	14	/	4	/	6	/	2	/	/	
4	13/02/2013	152	24	/	14	/	2	4	7	/	31	/	2	
	30/05/2013	159	14	2	12	4	/	2	11	/	20	/	/	
5	13/02/2013	186	4	/	8	2	/	2	4	/	4	/	/	
	30/05/2013	175	4	/	6	4	6	/	4	/	2	/	/	
6	13/02/2013	182	2	/	4	6	/	/	15	/	/	/	/	
	30/05/2013	172	10	2	8	/	/	6	4	/	/	/	/	
7	13/02/2013	170	14	/	12	/	8	/	6	/	2	/	/	
	30/05/2013	177	6	/	4	2	9	2	12	/	6	/	/	
8	13/02/2013	180	4	4	/	/	3	2	6	/	/	/	/	
	30/05/2013	181	8	/	2	/	4	/	6	/	/	/	/	
9	13/02/2013	30	42	8	19	2	3	4	8	/	96	/	4	
	30/05/2013	19	40	4	8	6	8	/	14	/	114	/	/	
10	13/02/2013	160	/	/	4	2	16	/	4	/	10	2	2	
	30/05/2013	157	14	2	7	/	/	/	10	/	16	/	/	
11	13/02/2013	170	14	/	9	2	4	/	13	/	6	/	/	
	30/05/2013	145	30	4	6	3	5	/	17	/	8	/	/	
12	13/02/2013	174	8	/	2	/	8	14	2	/	6	/	/	
	30/05/2013	186	6	/	4	/	6	/	12	/	/	/	/	
13	13/02/2013	84	32	/	26	/	/	/	11	/	37	/	6	
	30/05/2013	89	24	/	16	6	12	14	22	6	29	/	/	
14	13/02/2013	180	14	/	6	2	/	6	/	/	/	/	/	
	30/05/2013	171	8	/	8	/	2	/	2	/	/	/	/	
15	13/02/2013	178	10	/	/	/	6	/	8	/	4	/	/	
	30/05/2013	181	6	/	8	2	/	/	4	/	/	/	/	
16	13/02/2013	36	2	/	/	/	9	4	12	3	6	146	/	
	30/05/2013	41	10	4	4	/	6	5	8	4	9	130	/	