



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI

Dipartimento di Medicina Veterinaria

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

(Direttore Prof. Sergio Ledda)

Indirizzo in Riproduzione, Produzione e Benessere Animale

XXVI CICLO

SVILUPPO DI UN SISTEMA DEFINITO PER LA
CRIOCONSERVAZIONE DEL SEME DI BECCO DI
RAZZA SARDA

Tesi di Dottorato della

Dott.ssa Sara Chelucci

Docente Guida:

Prof. Salvatore Naitana

Direttore:

Prof. Sergio Ledda

Anno Accademico 2012-2013

*A babbo e mamma,
senza di loro nulla sarebbe stato possibile*

INDICE

1. INTRODUZIONE	7
<i>1.1 IMPORTANZA DELLA CRIOCONSERVAZIONE DEL SEME</i>	7
1.2 FISIOLOGIA DELLO SPERMATOZOO	9
<i>1.2.1 STRUTTURA</i>	9
<i>1.2.2 METABOLISMO E ATTIVITA' MITOCONDRIALE</i>	10
<i>1.2.3 SPERMATOGENESI</i>	11
<i>1.2.4 MATURAZIONE EPIDIDIMALE</i>	13
<i>1.2.5 CAPACITAZIONE</i>	18
1.3 LA CRIOCONSERVAZIONE	21
<i>1.3.1 CONSERVAZIONE DEL SEME ALLO STATO LIQUIDO</i>	22
<i>1.3.1.1 Stoccaggio a temperature ridotte</i>	22
<i>1.3.2 CONGELAMENTO DEL SEME</i>	25
<i>1.3.2.1 Diluenti a base di citrato e zuccheri</i>	26
<i>1.3.2.2 Diluenti a base di latte</i>	27
<i>1.3.2.3 Diluenti a base di lattosio</i>	28
<i>1.3.2.4 Diluenti a base di saccarosio</i>	28
<i>1.3.2.5 Diluenti a base di raffiniosio</i>	29
<i>1.3.2.6 Diluenti a base di Tris</i>	30
<i>1.3.3 AGENTI CRIOPROTETTIVI E METODI DI ADDIZIONE AL SEME</i>	31
<i>1.3.3.1 Glicerolo</i>	31
<i>1.3.3.2 Tuorlo d'uovo</i>	34
<i>1.3.3.3 Effetti del congelamento</i>	36
<i>1.3.4 SCONGELAMENTO DEL SEME</i>	42
1.4 LECITINA DI SOIA	45

1.5 COLESTEROLO	47
1.6 TREALOSIO	53
1.7 MELATONINA	58
1.8 ANTIOSSIDANTI	61
1.8.1 STRESS OSSIDATIVO E SUOI EFFETTI SULLA FERTILITA' DEL SEME.....	61
1.8.2 ANTIOSSIDANTI.....	65
2. SCOPO DELLA TESI	67
3. MATERIALI E METODI	71
3.1 PRELIEVO DEL MATERIALE SEMINALE E VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' SPERMATICA SUL SEME FRESCO.....	71
3.1.1 Vitalità spermatica.....	73
3.1.2 Motilità spermatica.....	74
3.1.3 Estrazione e dosaggio dell'ATP intracellulare.....	75
3.1.4 Analisi statistiche	76
3.2 METODICHE DI CONGELAMENTO.....	76
3.3 DISEGNO SPERIMENTALE.....	77
3.3.1 1° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL TREALOSIO ADDIZIONATO ALL'EXTENDER BASE SENZA TUORLO	77
3.3.2 2° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA MELATONINA ADDIZIONATA ALL'EXTENDER CON TUORLO.....	78
3.3.3 3° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL TREALOSIO E DELLA MELATONINA ADDIZIONATI ALL'EXTENDER BASE	79
3.3.4 4° ESPERIMENTO: UTILIZZO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI LECITINA 1% - 6%.....	80

3.3.5 5° ESPERIMENTO: UTILIZZO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI LECITINA 1% - 20%.....	80
3.3.6 6° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA LECITINA CON LA MELATONINA...	81
3.3.7 7° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLE DIVERSE CONCENTRAZIONI DI COLESTEROLO.....	82
3.3.8 8° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL COLESTEROLO CON LA MELATONINA.....	83
3.3.9 9° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA LECITINA COL TREALOSIO IN CONGELAMENTO.....	83
3.3.10 10° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL COLESTEROLO COL TREALOSIO IN CONGELAMENTO.....	84
3.3.11 11° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLE MIGLIORI CONCENTRAZIONI DI LECITINA E COLESTEROLO DA SOLI E ASSOCIATI AL TREALOSIO, CONFRONTATE CON L'EXTENDER TUORLO E UN EXTENDER COMMERCIALE.....	85
3.4 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' SPERMATICA DOPO SCONGELAMENTO.....	86
3.4.1 Frammentazione del DNA (Comet assay)	87
3.4.2 Determinazione della capacità antiossidante totale	89
3.4.3 Dosaggio dei tioli totali e del glutatione.....	90
3.4.4 Fertilizzazione eterologa	90
3.4.5 Analisi statistica	93
4 RISULTATI 1° ESPERIMENTO.....	94
4.1 Seme fresco.....	94
4.2 Vitalità spermatica.....	94

4.3	<i>Motilità progressiva e rapidi</i>	95
4.4	<i>Livelli di ATP</i>	96
5.	RISULTATI 2° ESPERIMENTO	97
5.1	<i>Seme fresco</i>	97
5.2	<i>Vitalità spermatica</i>	97
5.2.1	<i>Primo grafico</i>	97
5.2.2	<i>Secondo grafico</i>	98
5.3	<i>Motilità progressiva e rapidi</i>	99
5.3.1	<i>Primo grafico</i>	99
5.3.2	<i>Secondo grafico</i>	100
5.4	<i>Livelli di ATP</i>	101
5.4.1	<i>Primo grafico</i>	101
5.4.2	<i>Secondo grafico</i>	101
5.5	<i>Antiossidanti</i>	102
6.	RISULTATI 3° ESPERIMENTO	104
6.1	<i>Seme fresco</i>	104
6.2	<i>Vitalità spermatica</i>	104
6.3	<i>Motilità progressiva e rapidi</i>	105
6.4	<i>Livelli di ATP</i>	106
7.	RISULTATI 4° ESPERIMENTO	107
7.1	<i>Seme fresco</i>	107
7.2	<i>Vitalità spermatica</i>	107
7.3	<i>Motilità progressiva e rapidi</i>	108
7.4	<i>Livelli di ATP</i>	109
7.5	<i>Antiossidanti</i>	110

8. RISULTATI 5° ESPERIMENTO	112
8.1 <i>Seme fresco</i>	112
8.2 <i>Vitalità spermatica</i>	112
8.3 <i>Motilità progressiva e rapidi</i>	113
8.4 <i>Livelli di ATP</i>	114
8.5 <i>Antiossidanti</i>	115
9. RISULTATI 6° ESPERIMENTO	117
9.1 <i>Seme fresco</i>	117
9.2 <i>Vitalità spermatica</i>	117
9.3 <i>Motilità progressiva e rapidi</i>	118
9.4 <i>Livelli di ATP</i>	120
9.5 <i>Antiossidanti</i>	120
10. RISULTATI 7° ESPERIMENTO	123
10.1 <i>Seme fresco</i>	123
10.2 <i>Vitalità spermatica</i>	123
10.3 <i>Motilità progressiva e rapidi</i>	124
10.4 <i>Livelli di ATP</i>	125
10.5 <i>Antiossidanti</i>	126
11. RISULTATI 8° ESPERIMENTO	128
11.1 <i>Seme fresco</i>	128
11.2 <i>Vitalità spermatica</i>	128
11.3 <i>Motilità progressiva e rapidi</i>	129
11.4 <i>Livelli di ATP</i>	130
12. RISULTATI 9° ESPERIMENTO	131

12.1 Seme fresco.....	131
12.2 Vitalità spermatica	131
12.3 Motilità progressiva e rapidi.....	132
12.4 Livelli di ATP	133
12.5 Antiossidanti.....	134
13. RISULTATI 10° ESPERIMENTO.....	136
13.1 Seme fresco.....	136
13.2 Vitalità spermatica.....	136
13.3 Motilità progressiva e rapidi.....	137
13.4 Livelli di ATP	138
13.5 Antiossidanti.....	138
14. RISULTATI 11° ESPERIMENTO.....	140
14.1 Seme fresco.....	140
14.2 Vitalità spermatica	140
14.3 Motilità progressiva e rapidi.....	141
14.4 Livelli di ATP	142
14.5 Antiossidanti.....	143
14.6 Prova di fertilizzazione eterologa.....	144
14.7 Frammentazione del DNA.....	146
14.7.1 Comet Ar.....	146
14.7.2 Head DNA.....	146
14.7.3 Tail DNA.....	147
15.DISCUSSIONE.....	149
16.CONCLUSIONI.....	166
17.BIBLIOGRAFIA.....	168

1. INTRODUZIONE

1.1. **IMPORTANZA DELLA CRIOCONSERVAZIONE DEL SEME**

La possibilità di determinare un arresto del tempo biologico di cellule e tessuti di origine animale o vegetale mediante la riduzione della temperatura, costituisce una forte esigenza in diversi settori della ricerca di base ed applicata, in particolar modo in quello delle tecnologie riproduttive.

La necessità di fertilizzare un ampio numero di animali col seme di maschi miglioratori per lunghi periodi o in momenti differenti dell'anno ha richiesto il trasporto del seme dai centri di raccolta al luogo di inseminazione, anche a lunghe distanze. Questa esigenza ha stimolato i ricercatori allo studio di sistemi di congelamento e stoccaggio del seme tramite metodi che riducono o arrestano il metabolismo dello spermatozoo e quindi ne prolungano la vita fertile.

Le potenzialità della crioconservazione del seme sono numerose e permettono di avere i seguenti vantaggi: l'utilizzo di maschi miglioratori per l'inseminazione ad un costo irrilevante anche a lunghe distanze, l'allargamento della valutazione genetica in programmi di selezione, la conservazione delle razze, l'incremento dello scambio di materiale genetico (Holt, 1997), la salvaguardia di soggetti appartenenti a particolari linee genetiche e/o a specie selvatiche in via di estinzione (Holt 1997; Andraby e Maxwell, 2007) e la diminuzione del rischio di trasmissione di malattie infettive ed infestive.

Per quanto riguarda le specie in via di estinzione la crioconservazione del materiale germinale viene utilizzata nei programmi di management genetico per queste specie e per le banche genetiche (Holt, 1997). Per quanto riguarda invece le specie domestiche nell'ariete, per esempio, è stato dimostrato che lo stoccaggio del seme congelato per 27 anni non ha avuto effetti negativi sulla fertilità, rendendo possibile la conservazione delle risorse genetiche di numerose razze (Salamon e Maxwell, 2006). Le banche del seme sono più sviluppate per le

razze domestiche che per quelle selvatiche, anche se il loro utilizzo è stato ampiamente promosso per facilitare la conservazione delle specie in pericolo (Wildt *et al.*, 1997).

1.2. FISIOLOGIA DELLO SPERMATOZOO

1.2.1 STRUTTURA

Lo spermatozoo è una cellula aploide, quasi del tutto priva di citoplasma, costituita da un grande nucleo, con cromosomi condensati che ostacolano l'attività trascrizionale per il rimpiazzo delle proteine, un acrosoma e una serie di mitocondri localizzati nella parte anteriore del flagello (Eddy e O'Brein, 1994). I mitocondri producono ATP, che viene consumato dalla cellula per consentire la motilità e un piccolo reticolo endoplasmatico o apparato del Golgi, che contribuisce a mantenere l'integrità della membrana (Medeiros *et al.*, 2002).

La forma e la grandezza della testa dello spermatozoo ne definiscono la crioconservabilità, con un rapporto inversamente proporzionale fra taglia della testa e resistenza al congelamento, come hanno dimostrato alcuni studi comparativi nel toro, verro, ariete, coniglio, cane e cavallo (Gao *et al.*, 1997).

Lo spermatozoo è formato da tre regioni: testa, collo e coda, suddivisa a sua volta in un segmento intermedio, uno principale e uno terminale. La testa è costituita quasi esclusivamente dal nucleo che contiene il materiale genetico. Il nucleo nella parte rostrale della testa è coperto da una struttura altamente specializzata, chiamata cappuccio acrosomiale, vescicola che origina dall'apparato del Golgi e che contiene gli enzimi che andranno a lisare la zona pellucida dell'oocita al momento della penetrazione. Il collo e la coda invece contengono le strutture adibite al movimento e un sistema di microtubuli chiamato assonema. Nel collo, il sito di connessione tra la testa e la coda, sono localizzati i mitocondri che producono energia sotto forma di ATP e i centrioli dai quali origina il sistema di microtubuli. Anche il segmento intermedio contiene molti mitocondri che si dispongono lungo la circonferenza dell'assonema a formare una doppia spirale. L'assonema occupa tutta la lunghezza della coda. Il citoplasma è ridotto al minimo e non devono esserci corpi

citoplasmatici residui (McKinnon e Voss, 1993).

La cellula spermatica, come ogni altra cellula, è avvolta da una membrana plasmatica a doppio strato fosfolipidico. Il colesterolo è il principale sterolo presente, serve per mantenere stabile l'organizzazione lamellare dei fosfolipidi ed è determinante nella modulazione della fluidità della membrana (Aurich, 2005); infatti più colesterolo è presente in una determinata regione, meno fluida o flessibile sarà la membrana stessa (McKinnon e Voss, 1993). La composizione lipidica e il contenuto di colesterolo varia tra specie, individui ed eiaculati dello stesso individuo, è correlata alla velocità di capacitazione e può anche influenzare la fertilità e l'adattabilità alla refrigerazione e al congelamento (concetto di good e bad freezer/cooler) (Aurich, 2005; Maldjian *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2000).

Le proteine contenute nella membrana cellulare si aggirano attorno al 50% e sono importanti perché formano recettori, canali di membrana e si legano a recettori epiteliali e a quelli presenti sulla zona pellucida dell'ocita (McKinnon e Voss, 1993). La loro quantità e distribuzione si modifica durante lo stoccaggio nell'epididimo e la capacitazione.

La membrana cellulare è ancorata alle strutture circostanti, riveste tutta la superficie cellulare ma durante la reazione acrosomiale la porzione che ricopre l'acrosoma viene persa e permette la liberazione degli enzimi idrolitici. Essa inoltre va incontro a modificazioni strutturali e fisiologiche durante la fase di capacitazione (McKinnon e Voss, 1993).

1.2.2 METABOLISMO E ATTIVITA' MITOCONDRIALE

Lo spermatozoo è una cellula che non possiede capacità biosintetiche e quindi non è in grado di riparare eventuali danni cellulari, di sintetizzare proteine e di dividersi.

Il metabolismo dello spermatozoo maturo è in grado di produrre solo l'energia necessaria per il movimento, per il ricambio e per il mantenimento dell'equilibrio osmotico. L'energia

spesa per il movimento ionico transmembrana è minima. La glicolisi avviene principalmente a spese dei monosaccaridi presenti nel plasma seminale, come il glucosio e il fruttosio, con un sistema ATP dipendente. Altri substrati che la cellula spermatica può utilizzare sono l'acido lattico, il glicerolo, gli acidi grassi e gli amminoacidi (De Vasconcelos *et al.*, 2009).

Il metabolismo aerobico ha sede nei mitocondri e la sintesi di ATP è il prodotto finale della fosforilazione ossidativa (McKinnon e Voss, 1993; Silva e Gadella, 2006). La funzionalità di questa via metabolica dipende dall'integrità della membrana mitocondriale interna ed esterna e dalla disponibilità di ossigeno.

1.2.3. SPERMATOGENESI

In considerazione delle sue caratteristiche strutturali il gamete maschile viene riconosciuto come una delle cellule più differenziate presenti nell'organismo animale della classe dei mammiferi. Per poter raggiungere il suo peculiare aspetto morfologico lo spermatozoo subisce una lunga serie di trasformazioni a partire dallo spermatogonio di tipo B, che rappresenta la cellula dismessa dal comparto germinale indifferenziato costituito dalla popolazione di spermatogoni di tipo A. Subito dopo la dismissione da tale comparto lo spermatogonio inizia una fase di profonde modificazioni che possono essere suddivise in due momenti: spermatogenesi e spermioistogenesi.

La spermatogenesi si divide a sua volta in due fasi: la prima fase, che è quella della mitosi, comprende la moltiplicazione per mitosi e la maturazione degli spermatogoni; la seconda fase, quella della meiosi, interessa invece gli spermatociti primari e comprende le due divisioni meiotiche che terminano con la produzione degli spermatidi aploidi.

La spermioistogenesi invece comporta una serie di modificazioni morfologiche e funzionali che portano alla trasformazione degli spermatidi in spermatozoi.

Le cellule germinali sono distribuite dalla periferia al centro dei tubuli seminiferi, a seconda della fase di sviluppo: alla periferia sono presenti gli spermatogoni che poggiano sulla lamina basale, seguono verso il centro una o due generazioni di spermatociti e una o due generazioni di spermatidi.

Nelle sezioni del tubulo seminifero si possono riscontrare diversi tipi di spermatogoni, che rappresentano stadi successivi di un processo maturativi; si distinguono infatti, a seconda della conformazione del nucleo e della distribuzione della cromatina al suo interno, spermatogoni di tipo A, di tipo intermedio e di tipo B. Più in particolare, la spermatogenesi inizia con uno spermatogonio A_1 , che si divide quattro volte producendo spermatogoni A_2 , A_3 , A_4 e spermatogoni intermedi; questi ultimi si dividono una sola volta dando origine agli spermatogoni di tipo B, la cui ulteriore divisione porta alla formazione degli spermatociti primari che iniziano la meiosi.

E' evidente, tuttavia, che non tutti gli spermatogoni A si trasformano in spermatociti e quindi in spermatozoi, altrimenti la spermatogenesi si arresterebbe non appena differenziati tutti gli spermatogoni A. La popolazione degli spermatogoni A deve quindi comprendere elementi staminali, dotati della capacità di dividersi indefinitamente, mantenendo costante il proprio numero e nel contempo di differenziarsi in spermatozoi. Esiste una popolazione di spermatogoni di tipo A (A_s) che si divide in maniera bivalente, per formare cellule staminali, che resteranno quiescenti durante tutto il ciclo di replicazione dell'epitelio seminifero e spermatogoni di tipo A_1 , che invece entrano a far parte del ciclo.

Ad ogni modo, la fase successiva della spermatogenesi, inizia con la prima delle due divisioni meiotiche, che dagli spermatociti primari e attraverso lo stadio di spermatociti secondari, portano alla formazione degli spermatidi. Queste cellule aploidi non sono destinate ad ulteriori divisioni, ma subiranno un complesso processo di trasformazione, denominato spermioistogenesi, che darà origine agli spermatozoi.

Le modificazioni più significative che hanno luogo durante questa fase riguardano fondamentalmente la forma generale della cellula, il nucleo, la condensazione della cromatina che diventa inattiva nella trascrizione dell'RNA, lo sviluppo del flagello e la differenziazione dell'acrosoma. Inoltre, alla fine della spermioistogenesi, la maggior parte del citoplasma viene eliminata dalla cellula, costituendo i cosiddetti “corpi residuali” che vengono fagocitati dalle cellule del Sertoli. Tuttavia, rimane attaccata allo spermatoide una piccola porzione di citoplasma, che sarà eliminata durante la maturazione dello spermatozoo nell'epididimo.

Ultimata la fase di spermioistogenesi lo spermatozoo viene rilasciato nel lume del tubulo seminifero dalla cellula del Sertoli, che lo ha difeso da possibili azioni di tipo immunologico grazie alla barriera ematotesticolare, lo ha alloggiato assecondandolo nelle modificazioni del suo citoplasma e lo ha supportato metabolicamente fornendogli le energie ed i substrati necessari per le trasformazioni cui gradatamente andava incontro. In questa fase il gamete maschile risulta morfologicamente molto simile allo spermatozoo maturo, ma la sua completa maturazione viene acquisita allorché raggiunge, con il liquido presente nel tubulo seminifero, l'epididimo. Se nel tubulo seminifero la trasformazione dello spermatogonio di tipo B è stata esclusivamente strutturale, in questo organo invece lo spermatozoo acquista tutti gli aspetti più strettamente funzionali, in grado di conferire alla cellula la capacità fecondante (De Jonge e Barrat, 2006).

1.2.4 MATURAZIONE EPIDIDIMALE

L'epididimo è un lungo dotto ripiegato su stesso che collega i canalicoli efferenti testicolari al deferente, viene generalmente suddiviso in tre regioni: la testa, il corpo e la coda.

L'epitelio che tappezza il suo lume è costituito da cinque tipi cellulari, che hanno sia una funzione assorbente che secernente. La composizione del liquido epididimale, comprendente

acqua, ioni, piccole molecole inorganiche, proteine e glicoproteine è infatti nettamente differente da quella del sangue o dei liquidi interstiziali, grazie alla selettiva captazione e concentrazione di ioni e piccole molecole da parte delle sue cellule.

La maggior parte del liquido prodotto dal testicolo viene riassorbito e ciò avviene soprattutto nei dotti efferenti e nella testa dell'epididimo, favorendo così una maggior concentrazione degli spermatozoi nella coda ed un incremento dell'osmolarità. Ma la caratteristica più importante del liquido epididimale è che la sua composizione sembra essere segmento specifica, così che gli spermatozoi sono esposti costantemente ad ambienti differenti man mano che proseguono lungo il loro tragitto.

La maturazione degli spermatozoi che si ha durante il passaggio lungo l'epididimo non è infatti un processo passivo, nel senso che non è sufficiente il semplice passaggio di tempo (circa 9-14 giorni), ma è necessaria l'esposizione al mutevole ambiente epididimale. Questa comporta notevoli modificazioni funzionali quali ad esempio l'acquisizione della motilità, una progressiva perdita di acqua, la migrazione in posizione distale e l'eventuale perdita della goccia citoplasmatica.

In particolare, l'acquisizione dell'attiva motilità rappresenta uno dei più importanti cambiamenti funzionali che si accompagnano alla maturazione degli spermatozoi ed è una condizione necessaria ma non sufficiente a garantirne la capacità fecondante. Lo sblocco dei meccanismi regolanti la motilità durante la maturazione potrebbe essere dovuto all'interazione con i secreti epididimali, considerando i vari cambiamenti nella composizione del liquido epididimale ai diversi livelli del dotto e l'influenza che questi possono avere nei confronti della concentrazione intracellulare di calcio, di AMPc e del pH. Si è visto che la motilità, infatti, è controllata dall'interazione di questi tre fattori. I livelli di AMPc sono cruciali e rappresentano sempre un equilibrio tra l'attività dell'adenilato ciclasi e quella della fosfodiesterasi, che a loro volta sono influenzate dal calcio e dal pH. L'AMPc attiva una

protein chinasi, che fosforila delle proteine axonemiche e stimola così l'attività flagellare. Questa è invece inibita da una fosfatasi, a sua volta sotto il controllo di specifici inibitori. L'energia per l'attività dello spermatozoo deriva ovviamente dall'ATP, che viene demolito dalla molecola della dineina alloggiata nel flagello.

Il processo della maturazione epididimale è caratterizzato anche da modificazioni a livello dell'acrosina. L'acrosina, una proteasi acrosomiale, è infatti sintetizzata sotto forma di un precursore enzimaticamente inattivo, la proacrosina. Quest'ultima verrebbe parzialmente convertita ad acrosina durante il tragitto lungo l'epididimo, preparandosi così alla conversione totale che avverrà al momento della reazione acrosomiale.

L'intera morfologia del nucleo spermatico non cambia significativamente durante la maturazione, solo la cromatina viene ulteriormente stabilizzata da ponti disolfuro fra molecole proteiche a livello dell'aminoacido cisteina, direttamente o tramite l'interposizione di atomi di zinco. La stabilizzazione della cromatina nucleare inizia con la sostituzione degli istoni con le protammine nell'ultima fase della spermiogenesi. Il materiale genetico risulta così ben protetto, circa 6 volte maggiore della cromatina nucleare presente durante la metafase, fino al momento della fecondazione. La forma affusolata della testa favorisce la sua progressione nei fluidi dell'apparato genitale femminile fino all'incontro con l'oocita. Nel corso della fecondazione avviene il processo inverso, le protammine devono essere riconvertite ad istoni per permettere la decondensazione del DNA nucleare dello spermatozoo ed iniziare la formazione del pronucleo maschile.

Le più significative modificazioni durante il corso della maturazione epididimale avvengono a livello della membrana plasmatica dello spermatozoo, quest'ultima infatti è direttamente esposta al fluido epididimale e viene modificata passo dopo passo quando lo spermatozoo attraversa le diverse regioni dell'epididimo (e i diversi ambienti).

La membrana plasmatica è già ricoperta da numerose molecole quando gli spermatozoi

lasciano il testicolo. Durante il passaggio lungo l'epididimo queste preesistenti molecole sono sia perse che modificate, mentre nuove macromolecole di origine epididimale vengono assorbite o integrate alla membrana plasmatica. L'alterazione delle glicoproteine preesistenti e l'assorbimento di nuove sembra essere mediato, almeno in parte, da enzimi epididimali, mentre la perdita nelle componenti della superficie spermatica potrebbe essere dovuta a tre fattori: il distacco dalla membrana, la modificazione nel peso molecolare a causa di una limitata proteolisi o per aggiunta di nuove molecole oppure il mascheramento da parte di altre molecole.

E' importante notare che le modificazioni coinvolgenti particolari componenti della membrana spesso occorrono in specifiche regioni dell'epididimo, suggerendo che la specializzazione nelle funzioni epididimali di queste regioni gioca un ruolo importante nei cambiamenti della superficie spermatica durante la maturazione epididimale.

Sempre durante il transito epididimale matura il sistema che permette il riconoscimento e l'adesione dello spermatozoo alla zona pellucida. Tali modifiche interessano i residui della galattosiltransferasi, che riconoscono specifici siti glicoproteici della zona pellucida denominati ZP3. La presenza di queste proteine nel liquido epididimale è strettamente dipendente dalla concentrazione degli androgeni. Queste proteine hanno anche un'importante funzione durante la fecondazione nel riconoscimento specie-specifico, impedendo eventuali fertilizzazioni interspecifiche.

Le glicoproteine non sono le uniche macromolecole che vengono modificate durante il tragitto lungo l'epididimo, anche i lipidi di membrana subiscono cambiamenti nelle loro caratteristiche fisiche e chimiche. Diminuisce così la percentuale di lipidi fosforati per cellula e molte classi di lipidi mostrano specifici cambiamenti nei loro acidi grassi costitutivi; aumenta la percentuale di acidi grassi insaturi, motivo per il quale gli spermatozoi diventano più sensibili agli insulti ossidativi e allo shock termico, mentre diminuisce il contenuto in

colesterolo, con conseguente modificazione della fluidità di membrana.

La maggior parte di queste modificazioni si hanno a livello della membrana plasmatica che ricopre il cappuccio acrosomiale, anche se in realtà tutta la superficie cellulare è coinvolta in questo processo.

La maturazione epididimale si completa quando gli spermatozoi raggiungono la coda dell'epididimo. In questa sede l'ambiente è molto favorevole alla loro sopravvivenza, tanto che essi possono restare immagazzinati in questo tessuto per lunghi periodi conservando le proprie funzioni.

Le cellule spermatiche non rimangono vitali indefinitamente, vanno incontro ad un graduale invecchiamento che comporta dapprima la perdita della capacità fecondante, poi della motilità ed infine la loro degenerazione nel dotto deferente. Pertanto se gli spermatozoi invecchiati non vengono eliminati dall'apparato riproduttore maschile ad intervalli regolari il seme sarà di qualità scadente. Il turnover degli spermatozoi è comunque abbastanza rapido, molti di essi infatti vengono eliminati giornalmente con l'urina, giustificando così la loro continua produzione.

Tutte le modifiche che lo spermatozoo subisce nel tratto epididimale sono sotto stretto controllo del testosterone che, prodotto dal testicolo, arriva all'epididimo con il liquido testicolare. Nell'epididimo l'elevata produzione dell'enzima 5-alfa-reduttasi permette la trasformazione del testosterone in diidro-testosterone, che rappresenta la forma ormonale attiva (De Jonge e Barrat, 2006).

1.2.5 CAPACITAZIONE

Anche se nel complesso le modifiche che avvengono durante la maturazione epididimale hanno lo scopo di rendere lo spermatozoo maggiormente resistente e più idoneo alla fecondazione, gli spermatozoi eiaculati non sono ancora capaci di fertilizzare la cellula uovo. Essi infatti, prima di guadagnare questa abilità, devono venire a contatto con le secrezioni dell'apparato genitale femminile e sostare per qualche tempo al suo interno.

Durante questo periodo gli spermatozoi subiscono delle modificazioni fisiologiche e funzionali, chiamate nel loro insieme capacitazione, che li rendono pronti a portare avanti il processo di fertilizzazione, tramite legame alla zona pellucida dell'ocita e attivazione della reazione acrosomiale (McKinnon, Voss, 1993). Pertanto le maggiori modificazioni che si verificano durante la capacitazione interessano sicuramente la membrana cellulare.

Queste modificazioni sono rappresentate dalla rimozione del colesterolo dal doppio strato fosfolipidico ad opera di albumine presenti nell'ambiente genitale femminile e dall'alterazione del contenuto proteico di membrana, che portano ad un aumento della fluidità, a modificazioni del flusso ionico transmembrana (in particolare l'ingresso massivo di ioni Ca^{2+} nella cellula), all'esposizione di siti recettoriali e alla rimozione dalla membrana di molecole che ricoprono il flagello e che sembrano impedire il suo movimento iperattivo. Le modificazioni a carico della membrana che ricopre la testa facilitano quindi il legame dello spermatozoo alla zona pellucida dell'ocita e l'innescio della reazione acrosomiale, quelle a carico della membrana che ricopre il flagello invece favoriscono la motilità iperattiva e i cambiamenti a carico della membrana mitocondriale, aumentano il metabolismo e agevolano la trasmissione di energia (McKinnon, Voss, 1993).

E' noto che, sia durante la maturazione epididimale che in seguito all'esposizione al plasma seminale, la membrana plasmatica dello spermatozoo viene stabilizzata dall'assorbimento o dall'integrazione di glicoproteine epididimali da una parte e componenti

del plasma seminale dall'altra, queste ultime sembrano legarsi saldamente alla superficie degli spermatozoi eiaculati. La capacitazione consiste, almeno in parte, nella graduale rimozione di questo materiale coprente la superficie della membrana spermatica, soprattutto nella regione acrosomiale. Questo porta all'esposizione di siti recettoriali che interagiscono specificatamente con i recettori della cellula uovo, permettendo così il riconoscimento tra i due gameti.

Inoltre le modificazioni morfologiche che si verificano a carico del plasmalemma durante la capacitazione portano alla formazione, a livello della regione acrosomiale, di aree specifiche in cui sono presenti particolari proteine intramembrana ed un'elevata concentrazione di fosfolipidi anionici. Queste aree mostrano poi proprietà fusogeniche quando si sviluppano le condizioni appropriate affinché si abbia la reazione acrosomiale. Questo evento è considerato uno dei maggiori indicatori dell'avvenuta capacitazione.

Anche a livello del contenuto acrosomiale si hanno importanti modificazioni funzionali, fra cui un aumento del pH, che provoca la conversione della proacrosina in acrosina attiva, essenziale per la penetrazione dei rivestimenti dell'oocita al momento della fertilizzazione. Le modificazioni a carico della membrana cellulare spermatica portano anche ad un'aumentata permeabilità nei confronti degli ioni calcio e l'aumento del calcio intracellulare è un requisito fondamentale per la capacitazione, rende infatti lo spermatozoo capace di portare avanti la reazione acrosomiale. Inoltre, elevati livelli intracellulari di calcio potrebbero essere coinvolti nell'attivazione dell'acrosina, nelle modificazioni della membrana acrosomiale che precedono la vesciculazione e nel controllo dell'adenilato ciclasi. Di conseguenza i fattori che influenzano la disponibilità del calcio e il suo uptake sono di massima importanza ai fini della capacitazione. E' noto che il plasma seminale contiene delle proteine a basso peso molecolare chelanti il calcio e dei fattori che ne inibiscono l'uptake da parte dello spermatozoo.

All'interno dell'apparato genitale femminile invece la concentrazione del calcio

extracellulare varia a seconda del tratto preso in considerazione e a livello dell'ovidotto varia anche a seconda del suo segmento specifico. Inoltre, è stato dimostrato come il microambiente tubarico è più capacitante di quello uterino, anche se il tempo minimo richiesto per una completa capacitazione da parte degli spermatozoi sembra essere sempre minore quando questi percorrono l'intero tratto genitale femminile (Hunter e Hall, 1974). Questo indica che probabilmente esiste un sinergismo tra l'ambiente tubarico e quello uterino ai fini della capacitazione spermatica.

Il potere capacitante del tratto genitale femminile varia anche a seconda del quadro ormonale della femmina, così come varia la concentrazione del calcio cellulare al suo interno (Clegg, 1983). Infatti, elevati livelli di estrogeni sembrano promuovere la capacitazione spermatica all'interno dell'utero, mentre il progesterone sembra agire in senso opposto (Bedford, 1974). A livello dell'ovidotto il ruolo del progesterone nel controllo della disponibilità extracellulare di calcio è molto più complesso, perché influenza non tanto la capacitazione, quanto l'attivazione controllata ed il rilascio di una certa quota di spermatozoi competenti dalle riserve dell'istmo al momento dell'ovulazione (Hunter, 1999).

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

1.3 LA CRIOCONSERVAZIONE

Gli studi sull'inseminazione artificiale nei piccoli ruminanti iniziarono con Ivanov (1907-1912), il quale brevettò dei medium di diluizione che ne permisero l'applicazione pratica sugli animali da reddito. Dopo la prima guerra mondiale nell'ex Unione Sovietica furono intraprese ulteriori ricerche sotto la leadership di Milovanov e già dal 1930 l'inseminazione artificiale con seme fresco e diluito fu utilizzata su larga scala nei programmi di allevamento dei piccoli ruminanti.

Un successivo esperimento di crioconservazione del materiale seminale è stato riportato da Bernstein e Petropavlovsky (1937), i quali utilizzarono una soluzione di glicerolo (1M 9,2%) per la conservazione del seme di diverse specie di mammiferi (coniglio, ariete, toro, stallone e verro) a -21°C. La tecnica di crioconservazione del gamete maschile e il suo successivo impiego per l'inseminazione artificiale (Polge *et al.*, 1949), combinata con la crioconservazione degli embrioni (Whittingham, 1971), ha accresciuto enormemente le potenzialità delle tecnologie riproduttive, permettendo l'applicazione pratica dell'inseminazione artificiale e dell'embrion transfer.

Tuttavia la crioconservazione induce sulla cellula spermatica la formazione di cristalli di ghiaccio, danni osmotici, fratture del citoplasma ed effetti negativi sul citoscheletro e sul genoma, che ne causano il danneggiamento. Per questo motivo spesso una bassa fertilità del seme congelato viene interpretata come conseguenza degli effetti negativi della crioconservazione e la ricerca scientifica è tutt'oggi impegnata per sviluppare le tecniche di congelamento al fine di migliorare la conservabilità del gamete maschile.

1.3.1 CONSERVAZIONE DEL SEME ALLO STATO LIQUIDO

Il metodo migliore per lo stoccaggio del seme allo stato liquido è la sua conservazione a ridotta temperatura (0-5 o 10-15°C) tramite inattivazione reversibile dello spermatozoo.

1.3.1.1 Stoccaggio a temperature ridotte

Fu Milovanov (1940, 1951) a descrivere il primo lavoro nel quale discusse i problemi dello stoccaggio del seme dei piccoli ruminanti in condizioni di refrigerazione. Alcuni ricercatori britannici (Chang et Walton, 1940) e molti studiosi sovietici sostennero che l'optimum di temperatura per lo stoccaggio fosse 10-15°C, mentre altri hanno riportato in seguito che la sopravvivenza del seme di toro e ariete è superiore dopo conservazione a 0-5°C.

Quando il seme viene stoccato a basse temperature, prossime a 0°C, è necessario prestare attenzione a non sottoporre gli spermatozoi a bruschi sbalzi di temperatura che causano irreversibili cambiamenti nelle cellule. Gli effetti dannosi dello shock da raffreddamento ("cold shock"), scoperti nel 1931 da Milovanov (1951), sono stati superati attraverso l'utilizzo di tecniche di congelamento che prevedono il graduale raffreddamento del seme a partire dalla temperatura ambiente e l'aggiunta di lipidi al diluente. Questi lipidi, la cui azione protettiva è stata riportata per la prima volta da Milovanov e Selivanova nel 1932 (citato da Milovanov, 1962), possono provenire da varie fonti (tuorlo d'uovo, testicoli, corpo luteo, cervello e semi di soia). Lardy e Phillips (1939) applicarono queste osservazioni per lo sviluppo di diluenti a base di tuorlo d'uovo-fosfato per la conservazione del seme di toro, mentre Salisbury (1941) e Willet (1942) elaborarono un altro medium di conservazione a base di tuorlo d'uovo-citrato.

Prima del 1940 il diluente principale usato nell'ex Unione Sovietica per la conservazione del seme di ariete era un medium a base di glucosio-fosfato-fosfolipidi (estratto di soia), il

GFO-5 che fu poi sostituito dal glucosio-citrato-tuorlo d'uovo (Milovanov, 1962). E' stato mostrato che le componenti del tuorlo d'uovo e più probabilmente la frazione di lipoproteine ad alto peso molecolare e bassa densità, oltre alla loro capacità di fornire protezione contro lo shock da raffreddamento, sono in grado di ridurre la perdita di enzimi acrosomiali e prevenire modificazioni degenerative nell'acrosoma durante la crioconservazione. La composizione del diluente citrato (per 100 ml di acqua milliQ) era la seguente: sodio citrato 2,37 g; glucosio 0,50 g; tuorlo d'uovo 15 ml; penicillina 100.000 u.i. e streptomicina 100 mg.

Nella prima metà degli anni 70 sono stati condotti diversi studi sull'uso di tamponi organici, partendo dal presupposto che questi hanno una migliore capacità tamponante del fosfato e del citrato, sono relativamente non tossici per le cellule e possono penetrare lo spermatozoo in modo da agire come tamponi intracellulari contro la variazione del pH oppure possono migliorare la tolleranza della cellula spermatica in seguito ad un aumento intracellulare di cationi monovalenti.

Per la conservazione del seme di toro, verro e ariete sono stati esaminati diluenti contenenti tris (idrossimetilaminometano) come maggiore componente dell'extender (Visser, 1975). Concentrazioni di tris fra 10 e 50 mM sono risultate inefficaci per il mantenimento della motilità e sul metabolismo dello spermatozoo di ariete e di conseguenza sono state studiate concentrazioni superiori risultate poi vantaggiose nei diluenti per il seme refrigerato. Alcuni autori (Evans e Maxwell, 1987) hanno raccomandato il medium a base di tris per il seme di ariete con la seguente composizione (per 100 ml di acqua MilliQ): tris 3,63 g; fruttosio 0,50 g; acido citrico 1,99 g; tuorlo d'uovo 14 ml; penicillina 100.000.u.i. e streptomicina 100 mg.

Al medium di conservazione sono stati addizionati anche zuccheri. La maggior parte dei ricercatori ha usato glucosio e fruttosio, sebbene il fruttosio sia il solo zucchero semplice presente nel seme dell'ariete, gli spermatozoi possono metabolizzare anche glucosio e

mannosio, quando inclusi nel medium di conservazione. Nessun'altro zucchero agisce come sorgente energetica, ma ne sono stati esaminati anche altri per la loro capacità di preservare la motilità dello spermatozoo. L'importanza del lattosio, saccarosio, raffinosio e trealosio nell'extender è legata alla capacità di queste sostanze di agire extracellularmente, creando una pressione osmotica che induce la disidratazione della cellula e riduce la formazione di cristalli di ghiaccio al suo interno. Questi zuccheri interagiscono con i fosfolipidi di membrana aumentando la sopravvivenza dello spermatozoo alla crioconservazione (Aisen *et al.*, 2002). Si è visto che un maggiore effetto crioprotettivo può essere ottenuto con i monosaccaridi piuttosto che con i disaccaridi, quando usati in combinazione col Tris (Molinia *et al.*, 1994), anche se l'aggiunta di alte concentrazioni di trealosio (disaccaride) all'extender fornisce un'elevata protezione nei confronti della motilità post scongelamento, della resistenza allo shock termico e dell'integrità dell'acrosoma (Aboagla e Terada, 2003). Per questo motivo il trealosio è stato incluso negli extenders di congelamento per l'ariete e il becco.

Altro diluente usato per molti anni come extender per il seme di ariete è il latte intero, scremato o ricostituito. Il successo di questo diluente è stato attribuito alla sua frazione proteica, che può agire come tampone sui cambiamenti di pH e come agente chelante contro la presenza di eventuali metalli pesanti. Esso può anche proteggere parzialmente gli spermatozoi durante la riduzione della temperatura. Si ritiene che il latte di vacca sia da preferire a quello di altre specie.

Prima del suo utilizzo per la diluizione del seme, il latte (intero scremato o ricostituito) dovrebbe essere riscaldato a 92-95°C per 8-10 minuti per inattivare la lactenina, presente nella frazione proteica, che è tossica per gli spermatozoi. Il diluente a base di latte ricostituito può essere preparato sciogliendo 9 g di latte scremato in polvere in 100 ml di acqua distillata. Per controllare la crescita microbica devono essere addizionati antibiotici (1000 u.i di penicillina e 1 mg di streptomina per ciascun millilitro di latte intero o scremato).

Alcuni studiosi hanno riscontrato che il latte scremato è migliore del latte intero per la conservazione del seme a 2-5°C. Quando combinato con antibiotici questo è risultato efficace quanto il tuorlo d'uovo-glucosio-citrato per la refrigerazione del seme di ariete. L'aggiunta di tuorlo d'uovo 5% e di glucosio 1% al latte scremato è stata messa in evidenza come fattore che incrementa la vitalità dello spermatozoo di ariete durante la refrigerazione (Feredean *et al.*, 1967). Per quanto riguarda il latte scremato ricostituito alcuni autori francesi hanno riscontrato che la vitalità e la fertilità dello spermatozoo di ariete migliorano dopo conservazione per 8-16 ore a 15°C piuttosto che a 5°C (Colas *et al.* 1968, 1974).

Il latte UHT (ultra-heat-treated) "long life", commercialmente disponibile, è stato riconosciuto soddisfacente come diluente per il seme fresco e per il mantenimento della vitalità degli spermatozoi durante la conservazione. Il latte UHT è vantaggioso perché sterile, non richiede quindi riscaldamento e può essere usato direttamente come diluente senza ulteriori trattamenti.

1.3.2 CONGELAMENTO DEL SEME

La prima testimonianza sul congelamento del seme di ariete è attribuita a Bernstein e Petropavlovsky (1937), i quali usarono con successo una soluzione di glicerolo (1M 9,2%) per la conservazione del seme anche di altri mammiferi e uccelli a -21C, mentre il glicerolo alla concentrazione del 18% ebbe un effetto tossico sugli spermatozoi. La proprietà crioprotettiva del glicerolo fu messa in evidenza da Polge *et al.* (1949), le cui scoperte diedero un grande impeto alla ricerca sulla crioconservazione del seme di mammiferi.

Negli anni 50 fu condotto un numero notevole di esperimenti sul congelamento del seme di ariete. Inizialmente su questa specie furono applicati il metodo e il diluente utilizzati per il toro, ma con scarsi risultati di fertilità (Blackshawe e Emmens, 1953; Dauzier, 1956), per cui

apparve ovvio che il metodo usato nel toro aveva delle limitazioni quando adottato su altre specie. Negli anni successivi di ricerca fu raccolta una maggiore quantità di notizie sugli aspetti riguardanti il congelamento del seme di ariete, quali i diluenti, gli agenti crioprotettivi, i metodi di refrigerazione-congelamento e i danni da crioconservazione.

I diluenti o extenders usati per la crioconservazione del seme sono delle soluzioni le cui componenti miscelate hanno la funzione di proteggere lo spermatozoo dalle offese criogenetiche (Salamon e Maxwell, 2006). Questo può avvenire attraverso adeguati valori di pH (che devono variare fra 6.75-7 per il seme dei mammiferi che ha un pH fisiologico di 7.2-7-8), sistemi tampone e giusta osmolarità. Pertanto gli extenders includono di solito un crioprotettore non penetrante (latte, tuorlo d'uovo), un crioprotettore penetrante (glicerolo, glicole etilenico, dimetilsulfosside), un sistema tampone (Tris, Test), uno o più zuccheri (glucosio, lattosio, raffinosio, saccarosio, trealosio), sali (sodio citrato, acido citrico) e antibiotici (penicillina, streptomina) (Evans e Maxwell, 1987). Nel becco e nell'ariete per esempio all'extender di congelamento vengono addizionati di frequente latte scremato in polvere o diluenti ipertonici a base di tris-glucosio (Evans e Maxwell, 1987).

I più comuni extenders utilizzati per la crioconservazione del seme possono essere classificati in base al loro uso e sviluppo (Salamon e Maxwell, 2006).

1.3.2.1 Diluenti a base di citrato e zuccheri

Alcuni autori hanno dibattuto su quale potesse essere lo zucchero migliore da includere nel medium a base di citrato. Usando come parametro di valutazione la sopravvivenza post scongelamento alcuni di loro hanno incluso l'arabinosio, altri il fruttosio e il glucosio.

A causa della discesa della pressione osmotica dovuta alla presenza del glicerolo nell'extender, sono stati scelti come diluenti utilizzabili con questi zuccheri delle soluzioni

ipertoniche a base di citrato-glucosio-tuorlo d'uovo o citrato-fruttosio tuorlo d'uovo, con una pressione osmotica di 8-12 atm.

Il seme di ariete tollera bene il suddetto valore di tonicità del diluente (anche se al di sopra del suo livello fisiologico di 7.7) e anche una concentrazione di glucosio e fruttosio doppia grazie alla capacità di questi monosaccaridi di penetrare lo spermatozoo ed eguagliare il gradiente osmotico (Salamon e Maxwell, 2006).

1.3.2.2 Diluenti a base di latte

Il latte è adatto al congelamento del seme di ariete, soprattutto nella forma ricostituita, combinato con arabinosio, fruttosio o tuorlo d'uovo. In studi comparativi di laboratorio alcuni ricercatori hanno riscontrato che le soluzioni a base di latte scremato pastorizzato (intero o ricostituito), citrato-tuorlo d'uovo, latte-glucosio-tuorlo d'uovo e citrato-glucosio-tuorlo d'uovo hanno un uguale valore. Altri autori invece hanno riportato una maggiore sopravvivenza del seme dopo scongelamento con l'utilizzo di latte scremato piuttosto che di diluenti a base di citrato-tuorlo d'uovo, fruttosio o lattosio.

L'azione protettiva del latte scremato è legata alla frazione proteica, costituita dalle caseine (Medeiros *et al.*, 2002). Si è visto inoltre che l'aggiunta di tuorlo d'uovo al latte riscaldato omogenizzato non ha incrementato la sopravvivenza degli spermatozoi allo scongelamento (Salamon e Maxwell, 2006). In molti laboratori preparazioni a base di latte vengono incluse in diluenti sintetici contenenti zucchero ed elettroliti.

Il medium INRA brevettato, a base di latte-citrato, è stato usato da numerosi ricercatori come porzione glicerolata dell'extender nel metodo di diluizione "two steps" (vedi *infra*) e addizionato al seme refrigerato parzialmente diluito con lattosio-tuorlo d'uovo. Il latte scremato è stato usato in Svezia per entrambe le porzioni della diluizione "two steps" e successivo congelamento del seme (Soderquist *et al.*, 1996).

1.3.2.3 Diluenti a base di lattosio

Il successo del lattosio come ottima componente dei diluenti per la crioconservazione del seme di toro ha incentivato la sua applicazione anche per altre specie di mammiferi.

I disaccaridi lattosio e saccarosio sono risultati più efficaci dei monosaccaridi nell'abbassamento della temperatura di cristallizzazione durante il congelamento, soprattutto quando combinati con EDTA-Na₂ e dietilamina (Platov, 1988).

La miscela lattosio-tuorlo d'uovo è stata usata sia per la parte glicerolata dell'extender che per la parte non glicerolata oppure solo per la frazione non glicerolata seguita dal medium commerciale INRA (Salamon e Maxwell, 2006).

1.3.2.4 Diluenti a base di saccarosio

Il saccarosio è stato il principale zucchero utilizzato per gli extenders sintetici grazie alla sua capacità di proteggere la membrana acrosomiale dello spermatozoo meglio del glucosio, fruttosio e lattosio (Milovanov e Sokolovskaja, 1980). Nell'extender a base di saccarosio vengono usati generalmente antiossidanti sintetici per inibire la perossidazione dei fosfolipidi dello spermatozoo, in particolare degli acidi grassi insaturi. La perossidazione può essere prevenuta lavorando in condizioni di anaerobiosi e includendo al diluente agenti antiossidanti e chelanti (EDTA).

Numerosi lavori sull'inibizione della perossidazione nei diluenti a base di saccarosio sono stati condotti da ricercatori sovietici. Questa procedura, creando condizioni di anaerobiosi (atmosfera di idrogeno o azoto) durante la lavorazione del seme per la refrigerazione, è risultata efficace ma difficilmente applicabile. Pertanto l'attenzione degli studiosi è stata focalizzata maggiormente sull'uso dell'antiossidante, prima di tutto su tocoferoli sintetici

(vitamina E) (Salamon e Maxwell, 2006). Il tocoferolo è risultato più efficace quando incluso in diluenti contenenti glucosio, EDTA- Na_2 e tris e quando il seme veniva lavorato in condizioni di anaerobiosio.

1.3.2.5 Diluenti a base di raffiniosio

Il raffiniosio è stato messo in evidenza come componente dei diluenti per la crioconservazione dagli studi di Nagase e Graham (1964) nel toro. Gli zuccheri ad alto peso molecolare proteggono maggiormente lo spermatozoo durante il congelamento rapido rispetto a quelli a basso peso molecolare. Alcuni autori hanno riportato come migliori per il seme di toro e ariete gli extenders contenenti trisaccaridi piuttosto che monosaccaridi o disaccaridi, per il loro effetto stabilizzatore del complesso lipidi-proteine di membrana (Salamon e Maxwell, 2006).

Nauk (1991) ha classificato i vari zuccheri in ordine decrescente in base a questa loro capacità: raffiniosio, saccarosio, lattosio, fruttosio e glucosio. Si è visto che l'effetto protettivo di questi zuccheri aumentava quando combinati con altri piuttosto che usati da soli.

Studi sulla miscela di sodio citrato con varie concentrazioni di zuccheri (arabinosio, glucosio, lattosio, raffiniosio) hanno portato all'elaborazione di un medium a base di raffiniosio (9,9%)-citrato (2%)-tuorlo d'uovo (15%)-glicerolo (5%) per il congelamento in pellets del seme di ariete (Salamon e Lightfoot, 1969). Questi autori hanno riscontrato che la pressione osmotica ottimale variava in funzione del tipo di diluente e che per il successo del congelamento del seme di ariete in pellets erano necessari diluenti ipertonici. La pressione osmotica ottimale per il diluente raffiniosio-citrato-tuorlo d'uovo era di 375-485 mosM. L'elevata pressione osmotica dovuta all'alta concentrazione di raffiniosio è risultata meno pericolosa per la sopravvivenza degli spermatozoi rispetto ad alte concentrazioni di citrato.

1.3.2.6 Diluenti a base di Tris

L'utilizzo di tris per l'extender di congelamento del seme di ariete fu riportato da diversi ricercatori già dagli anni 70. Studi sistematici sul tris come componente base del diluente per il congelamento in pellets sono stati intrapresi da Salamon e Visser (1972), dalle loro ricerche è emerso che lo spermatozoo di ariete tollerava concentrazioni di tris entro un range fra 250 e 400 mM e che l'aggiunta di glucosio dava risultati migliori rispetto al fruttosio, lattosio e raffinoso (Salamon e Maxwell, 2006).

Fischer (1990) scoprì che il tris con osmolarità 375 mOsm/kg, contenente 2% di tuorlo d'uovo, era migliore nel preservare l'integrità dell'acrosoma e la motilità post scongelamento. La combinazione di 30-290 mM di zuccheri (mono e disaccaridi) con tris 100-300 mM (osmolarità di 325 mosmol) non ha influenzato la motilità post scongelamento e la fertilità dello spermatozoo (Molinia *et al.*, 1994). Tuttavia altri studi hanno messo in evidenza una migliore efficacia del tris in vitro quando combinato con lattosio piuttosto che glucosio, saccarosio o latte (Zamfirescu *et al.*, 1980). In studi in vitro Triledyl (diluente commerciale a base di Tris) ha dimostrato di avere valore uguale e anche superiore rispetto al lattosio-tuorlo d'uovo e saccarosio-lattosio-tuorlo d'uovo e l'aggiunta di albumina di siero bovino 2% ha incrementato il suo effetto protettivo sull'integrità dell'acrosoma. Tuttavia dopo inseminazione le percentuali di concepimento sono state migliori per il seme congelato con medium a base di saccarosio (Marinov *et al.*, 1983).

L'accoppiamento tris-fruttosio è stato usato nella prima parte del diluente per il metodo di congelamento "two steps" (vedi infra) descritto da Fiser *et al.* (1987) e il tris è stato anche incluso nei diluenti a base di lattosio o saccarosio. Il diluente tris-glucosio elaborato da Salamon e Visser (1972) è stato ampiamente usato per il congelamento del seme di ariete (Salamon, 1976; Evans e Maxwell, 1987).

Extenders a base di tris elaborati più di recente per la crioconservazione del seme di toro,

ariete e becco normalmente contengono fruttosio o lattosio, abbassando la loro normale concentrazione comparata con gli altri extenders (Purdy, 2006).

1.3.3 AGENTI CRIOPROTETTIVI E METODI DI ADDIZIONE AL SEME

1.3.3.1 Glicerolo

Il glicerolo è il più comune crioprotettore usato nei diluenti per il congelamento del seme di ariete. Molti ricercatori hanno riscontrato che per il congelamento con il metodo convenzionale lento (slow conventional method), usando principalmente diluenti ipertonici, la concentrazione ottimale di glicerolo è del 6-8%, mentre spermatozoi congelati col metodo rapido in pellets sopravvivono meglio con concentrazioni del 3-4%. Graham *et al.* (1978) hanno riportato che livelli di glicerolo sopra il 6% sono dannosi per la sopravvivenza dello spermatozoo dopo scongelamento. E' stato suggerito che la concentrazione ottimale di glicerolo nel seme diluito sia anche legata alla concentrazione finale del seme stesso (Colas, 1975).

L'azione del glicerolo sul seme di toro e ariete appare differente, esso sembra penetrare meglio nello spermatozoo di ariete (Nauk *et al.*, 1970), anche se la percentuale da includere nel diluente per la conservazione del seme di questa specie è limitata dalla sua tossicità (Fahy, 1986), che a sua volta dipende dalla velocità di refrigerazione e congelamento, dalla composizione del diluente e dal metodo di aggiunta del glicerolo stesso. Studi sugli effetti combinati delle diverse concentrazioni di glicerolo e della velocità di congelamento (0-8% pellettando in ghiaccio secco e poi azoto liquido, Visser e Salamon, 1974 e 0-16% congelando a 1-100°C/min, Fiser e Fairfull, 1984), hanno mostrato che maggiore è la velocità di raffreddamento minore è la concentrazione ottimale di glicerolo e che il migliore tasso di sopravvivenza dopo scongelamento si ottiene con una concentrazione di glicerolo del 4-6%

con una velocità di congelamento di 10-100°C/min (Byrne *et al.*, 2000; Anel *et al.*, 2003).

Oltre che dalla velocità di congelamento la concentrazione ottimale di glicerolo dipende anche dalla composizione del diluente e in particolare dalla sua pressione osmotica (Salamon, 1968; Lightfoot e Salamon, 1969). Inoltre la percentuale di glicerolo può essere influenzata dal quantitativo di tuorlo d'uovo nel diluente, in quanto concentrazioni via via maggiori di tuorlo possono ridurre la quantità necessaria di glicerolo (Watson e Martin, 1974).

Alcuni lavori indicano che l'aggiunta di antiossidanti con effetto crioprotettivo può consentire l'utilizzo di una concentrazione relativamente bassa di glicerolo (3,5%; 2,5% o 2%) (Varnavskij e Varnavskaja, 1976; Milovanov *et al.*, 1985).

Il glicerolo può essere addizionato al seme in una frazione separata del diluente (metodo "two steps") oppure tramite la sola aggiunta del diluente contenente glicerolo (metodo "one step"). Nel primo caso il seme subisce la prima diluizione con extender senza glicerolo, che viene poi aggiunto a 4°C e agisce solo per 20 minuti (Evans e Maxwell, 1987); nel secondo caso l'extender con cui si diluisce il seme per la fase di discesa termica fino a 4°C è già glicerolato e la sua azione pertanto inizia a 30°C. In entrambi i metodi è necessario un sistema di congelamento che porti il seme alla temperatura di refrigerazione (2-5°) nell'arco di 1-3 ore. Il rapido raffreddamento del seme da 30°C a circa 15°C può non avere effetti sulla sopravvivenza degli spermatozoi, ma la rapida riduzione della temperatura da 30°C a 10°C, 5°C o 0°C ne diminuisce la motilità post scongelamento (Fiser e Fairfull, 1986).

Inizialmente è sembrato migliore addizionare la porzione glicerolata dell'extender a 29°C piuttosto che a 5°C, ma in test successivi l'aggiunta a 5°C è risultata più soddisfacente per molti ricercatori, tuttavia alcuni non hanno trovato differenza fra l'addizione a 32°C o 3°C oppure a 22°C o 5°C. (Salamon, Maxwell 2006).

Alcuni autori francesi (Colas e Brice, 1975) raccomandarono l'utilizzo del metodo "two steps", con aggiunta del glicerolo a 5°C. Colas (1975) suggerì inoltre che il glicerolo potesse

essere leggermente tossico per lo spermatozoo anche alla concentrazione del 4% e che i suoi effetti dannosi fossero minori quando aggiunto a temperature sempre più prossime a 0°C. I ricercatori che usano il metodo di congelamento “two steps” raccomandano l’aggiunta del diluente contenente glicerolo a 2-5°C. Tuttavia alcuni hanno visto che la singola addizione della porzione glicerolata prima della refrigerazione (a 5°C) risultava altrettanto efficace della graduale aggiunta in porzioni separate (Salamon, Maxwell 2006).

In contraddizione a chi raccomanda l’uso della diluizione “two steps” Salamon (1968), Lightfoot e Salamon (1969) hanno riportato, per il seme di ariete congelato in pellets, che una singola diluizione a 30°C con extender contenente glicerolo (“one step” method) è efficace quanto il metodo “two steps” (Salamon, 1976; Evans e Maxwell, 1987) e dipende dalla composizione zuccherina del diluente. La presenza di raffinosio nel diluente permette un’equilibratura fino a 2,5°C in 1 ora. Da alcuni ricercatori il metodo “one step” con medium glicerolato è stato usato e raccomandato per congelare il seme dopo 1,5-2 ore di discesa termica fino a 5°C (Salamon, 1976; Evans e Maxwell, 1987).

Il glicerolo ha anche effetti tossici, può causare danni strutturali durante la fase di discesa termica. Di conseguenza è stato suggerito che potrebbe essere aggiunto non più di 20-30 minuti prima del congelamento. L’azione crioprotettiva dopo breve contatto (5-10 s) con il glicerolo è stata dimostrata per il toro, il verro e l’ariete (0-5 min) e questo supporta la teoria secondo la quale la penetrazione del glicerolo nelle cellule non è essenziale per la crioprotezione, rendendo questo un punto controverso.

Alcuni autori (Abdelhakeam *et al.*, 1991) hanno provato a congelare il seme di ariete senza glicerolo, diluendolo a 5°C, tre ore dopo la raccolta, con un tampone ipertonico contenente 25-30% di tuorlo d’uovo e 10% di maltosio monoidrato.

Oltre al glicerolo sono stati esaminati numerosi agenti per il loro effetto crioprotettivo sul seme di ariete, come il dimetilsolfossido (DMSO), il glicole etilenico, l’albumina, composti

polimerici, surfattanti, zuccheri di vario tipo ad alte concentrazioni, soluti quali prolina, glicine, betaina, taurina e anche proteine antigelo estratte da pesci (Salamon e Maxwell, 1995), ma fra tutti il glicerolo rimane il migliore agente crioprotettivo (Salamon e Maxwell, 2006).

1.3.3.2 *Tuorlo d'uovo*

Fra le fonti lipoproteiche il tuorlo d'uovo ha rappresentato negli anni passati il più importante agente crioprotettivo. I suoi benefici effetti sono stati descritti per la prima volta nel toro da Philips nel 1939 (Philips, 1939) e per questi il tuorlo d'uovo viene usato routinariamente con successo negli extenders di congelamento per il seme di molte specie domestiche e selvatiche, come agente protettivo in grado di aumentare la resistenza dello spermatozoo allo shock da raffreddamento (Bogar, Mayer, 1950).

Questa capacità è resa possibile grazie alla frazione di lipoproteine a bassa densità (LDL-Low density Lipoproteins) (Medeiros *et al.*, 2002; Purdy, 2006), maggiori costituenti del tuorlo (2/3 della sostanza secca), che viene definita come la sua componente attiva (Pace e Graham, 1974; Foulks, 1977) nei confronti delle membrane fosfolipidiche.

Già dal 1974 Pace and Graam hanno purificato il tuorlo d'uovo usando l'ultracentrifugazione e hanno osservato che la frazione a bassa densità ha un'azione crioprotettiva nel seme di toro (Watson e Martin, 1975). Molti altri ricercatori hanno confermato questo risultato in altre specie come l'ariete (Watson e Martin, 1975), il verro (Jiang *et al.*, 2007) e il cane (Bencharif *et al.*, 2008), per i quali sono state esaminate un'ampia varietà di concentrazioni.

Per il congelamento del seme di ariete in paillettes sono risultate sufficienti percentuali di tuorlo d'uovo del 3-6%, ma per il congelamento in pellets la concentrazione ottimale riportata è del 15-17%, sebbene gli effetti dipendano dalla composizione del diluente (Salamon e

Lightfoot, 1969). Alcuni ricercatori hanno esaminato concentrazioni di tuorlo d'uovo a partire da 1,5-3,75%, mentre altri (Graham *et al.*, 1978) hanno trovato che questi livelli non erano soddisfacenti.

Il complesso saccarosio-EDTA-CaNa₂ permette l'uso di basse concentrazioni (4-5%) di tuorlo d'uovo ed è stata anche suggerita la sua eliminazione (Milovanov *et al.*, 1985). D'altro canto come riportato da Abdelhakeam *et al.* (1991) per congelare il seme senza glicerolo sarebbe necessario aumentare la concentrazione di tuorlo fino a 20-30% e comunque il glicerolo, per la sua capacità di proteggere la membrana plasmatica, rimane una componente indispensabile del diluente per il congelamento del seme di ariete.

Le lipoproteine a bassa densità (LDL) non sono considerate le migliori molecole del tuorlo con capacità crioprotettiva. In queste sono infatti presenti particelle sferiche di circa 35 nm di diametro con un nucleo di trigliceridi, colesterolo e esteri del colesterolo circondati da uno strato di apoproteine e fosfolipidi (Martin, 1964).

Di solito i protocolli di congelamento del seme includono l'aggiunta di tuorlo d'uovo all'extender prima della refrigerazione e solo dopo l'aggiunta della porzione glicerolata dell'extender, anch'essa contenente tuorlo, anche se questo metodo non fornisce informazioni precise circa il suo ruolo durante il processo di congelamento.

Inoltre negli ultimi anni sono sorti dei dubbi sull'effettiva efficienza del tuorlo d'uovo dovuti all'ampia variabilità dei suoi costituenti e considerando che il suo utilizzo non è privo di svantaggi. Fra questi i tre più importanti sono:

- 1) Il tuorlo d'uovo è una componente di origine animale e rappresenta un potenziale rischio di contaminazione batterica dell'inseminazione artificiale perché ogni inquinamento è una possibile fonte di endotossine capaci di danneggiare lo spermatozoo e quindi comprometterne la fertilità (Bousseau *et al.*, 1998);

- 2) Il tuorlo d'uovo non è pratico perché non è pronto per l'uso. Infatti prima di

aggiungerlo all'extender è necessario isolarlo rompendo manualmente il guscio dell'uovo, staccando la membrana vitellina ed eliminando con cura ogni traccia di albume. Inoltre la presenza di materiale granulare (della stessa forma e grandezza degli spermatozoi) al suo interno può interferire con le osservazioni al microscopio e con i saggi biochimici;

3) Il tuorlo d'uovo è un prodotto estremamente complesso e variabile per la sua composizione lipidica che può differire in relazione alla dieta della gallina. Inoltre il tuorlo può contenere componenti sia benefiche che dannose per lo spermatozoo. Sono state infatti riportate sostanze presenti al suo interno che inibiscono la respirazione dello spermatozoo e ne riducono la motilità (Kampschmidt *et al.*, 1953) (Watson e Martin, 1975);

Trovare molecole alternative al tuorlo d'uovo è difficile perché, nonostante i suoi effetti durante il rapido raffreddamento siano stati ampiamente studiati (Watson, 1981; Quinn *et al.*, 1980), il preciso meccanismo attraverso il quale esso protegge lo spermatozoo durante il congelamento rimane ancora poco compreso.

1.3.3.3 *Effetti del congelamento*

Di norma i metodi di crioconservazione includono tre fasi: refrigerazione, congelamento (con addizione di crioprotettori al diluente) e successivo scongelamento.

Gli spermatozoi sottoposti a crioconservazione sono molto sensibili alla rapida riduzione della temperatura da 27 a 4°C (Watson, 1981; White 1993), che causa shock da raffreddamento ("cold shock"), disidratazione cellulare (Medeiros *et al.*, 2002), induce una fase di transizione delle membrane cellulari (Morris e Clarck, 1987) cui consegue perdita dell'integrità e della permeabilità selettiva (Ortman *et al.*, 1994), il rilascio di enzimi intracellulari (Harrison e White, 1972) e di lipidi (Darin-Bennet *et al.*, 1973; Ticket e Komarek, 1967), una redistribuzione di ioni (Quinn e White, 1966; 1968), modificazioni nell'acrosoma (Jones e Martin, 1973) e nei mitocondri (Watson, 1995), con perdita della

motilità e rallentamento del metabolismo. L'abbassamento della temperatura fino alla refrigerazione (4°C) riduce il metabolismo cellulare mentre la crioconservazione interrompe l'attività della cellula, che riprenderà le sue normali funzioni dopo lo scongelamento (Mazur, 1984).

I maggiori cambiamenti che accorrono durante la refrigerazione sono ultrastrutturali, biochimici e funzionali. Si riscontra un indebolimento il trasposto, un abbassamento della sopravvivenza dello spermatozoo nel tratto riproduttivo femminile e una riduzione della fertilità (Salamon e Maxwell, 2000). I danni sono stati riscontrati più frequentemente nella membrana plasmatica, nell'acrosoma, nei mitocondri e nell'assonema (Salamon e Maxwell, 2000).

Nelle specie domestiche il rapido raffreddamento da 30 a 0°C causa ingiurie nelle cellule chiamate "shock da raffreddamento" (cold shock) che sono dipendenti dalla velocità di discesa termica (Watson, 2000). Il tempo di congelamento deve essere infatti abbastanza lungo da permettere all'acqua di uscire dalle cellule per osmosi, prevenendo la formazione di cristalli di ghiaccio che causano danni irreversibili (Fisher e Fairfull, 1986).

Durante la refrigerazione lenta (0,5-1°C/min) la riduzione della temperatura induce comunque stress alla membrana plasmatica, da attribuire probabilmente al cambiamento di fase nel doppio strato lipidico della membrana stessa e ad alterazioni del suo stato funzionale (Watson, 2000). Gli stress causati dalla formazione di cristalli di ghiaccio sono associati ai cambiamenti di pressione osmotica nella soluzione di congelamento (Medeiros *et al.*, 2002). La permeabilità della membrana risulta aumentata dopo il congelamento probabilmente per la presenza di fessure in questa e in specifici canali proteici.

Il processo di discesa termica intacca anche la regolazione del calcio, evento che porta a conseguenze sulla funzionalità cellulare, compresa la morte. L'assorbimento di calcio influenza la capacitazione dell'acrosoma e i cambiamenti legati alla fusione fra la membrana

plasmatica e l'acrosoma stesso, essendo la membrana cellulare una struttura suscettibile di modificazioni durante la capacitazione. Lo shock da raffreddamento riduce la permeabilità della membrana all'acqua e ai soluti e danneggia la membrana acrosomiale (Purdy, 2006).

I processi di congelamento inoltre inducono negli spermatozoi modificazioni simili alla capacitazione (Schembri *et al.*, 2003; Silva, Gadella, 2006; Milani *et al.*, 2010; Bailey *et al.*, 2000), soprattutto con l'utilizzo di diluitori a base di latte e glucosio (Schembri *et al.*, 2003). In uno studio (Schembri *et al.*, 2003) è stato dimostrato come, indipendentemente dal mestruo diluitore utilizzato, allo scongelamento aumenta la proporzione di spermatozoi andati incontro alla capacitazione e alla reazione acrosomiale rispetto a quelli non capacitati e come la percentuale di spermatozoi progressivamente motili (e quindi non capacitati) sia influenzata dal tipo di mestruo diluitore utilizzato. L'autore ipotizza che le diverse caratteristiche dei diluitori possano indurre modificazioni di membrana a velocità diverse (Schembri *et al.*, 2003).

La ridotta fertilità del seme congelato rispetto al seme fresco può essere in parte dovuta al fatto che nel primo aumenta la quota di spermatozoi capacitati, che non avendo più un movimento di tipo lineare, raggiungono le tube uterine con maggiore difficoltà. Questi sono inoltre più fragili, instabili e con una vita

più breve. Spermatozoi con la reazione acrosomiale già avvenuta perdono parte del loro potenziale di fecondazione (Schembri *et al.*, 2003).

Le modificazioni biochimiche indotte dal congelamento includono il rilascio di glutammiche ossalacetiche transaminasi (GOT), la perdita di proteine e aminoacidi, il decremento dell'attività fosfatase, lo squilibrio del rapporto sodio-potassio, l'inattivazione della ialuronidasi e dell'enzima acrosina, la perdita di prostaglandine, la riduzione di ATP e la sintesi di ADP e il decremento dell'attività proteolitica dell'acrosoma (Salamon e Maxwell, 2006).

Gli effetti dannosi del congelamento sulla membrana spermatica variano da specie a specie e sono influenzati da numerosi elementi quali il rapporto colesterolo-fosfolipidi e il contenuto di lipidi presente nel by layer della membrana plasmatica (Medeiros *et al.*, 2002).

Per queste ragioni nel medium di congelamento vengono inclusi crioprotettori con lo scopo di ridurre gli stress chimici e fisici derivati dalla refrigerazione e dal congelamento (Gao *et al.*, 1997; Purdy, 2006).

I crioprotettori possono essere divisi, in base alla loro modalità d'azione, in penetranti e non penetranti. I crioprotettori penetranti (glicerolo, dimetilsolfossido, glicole etilenico) determinano il riarrangiamento della membrana lipidica-proteica, con successivo aumento della fluidità, maggiore disidratazione alle basse temperature, conseguente minore formazione di cristalli di ghiaccio intracellulari e quindi aumento della sopravvivenza (Purdy, 2006).

Il glicerolo e il dimetilsolfossido possono indurre stress osmotici ed effetti tossici sugli spermatozoi, ma l'entità del danno varia in relazione alla specie e dipende dalla loro concentrazione nell'extender (Purdy, 2006).

I crioprotettori non penetranti (tuorlo d'uovo, latte scremato, aminoacidi, trealosio e altri zuccheri) non attraversano la membrana plasmatica e agiscono solo a livello extracellulare (Aisen *et al.*, 2000). Essi possono modificare la membrana plasmatica o agire come soluti abbassando la temperatura di congelamento del medium e diminuendo la formazione di cristalli di ghiaccio all'interno della cellula (Amman, 1999; Kundu *et al.*, 2002).

Idealmente la velocità di congelamento dovrebbe evitare che la formazione di cristalli di ghiaccio distrugga le cellule e i tessuti (Arav *et al.*, 2002). Arav (1999) ha sviluppato un metodo di congelamento lento chiamato "Multi-Thermal-Gradient" con l'obiettivo di ridurre il danno cellulare durante la crioconservazione. Questa tecnica è basata sul congelamento direzionale, per cui il materiale biologico viene spostato attraverso un gradiente di temperatura lineare, così che la velocità di congelamento e la fonte di propagazione dei

crystalli di ghiaccio vengono precisamente controllati. Questo autore ha ottenuto buona motilità post scongelamento negli uccelli (45%), nell'ariete (57%), nel toro (65%), nello stallone (50%) e nel verro (45%).

I maschi possono essere classificati in buoni e cattivi congelatori in funzione dell'attitudine del loro seme a supportare il congelamento con piccoli danni. La membrana plasmatica presenta diverse caratteristiche nella sua struttura, dipendenti da fattori genetici individuali, come suggerito dal fatto che alcuni ceppi di topi hanno una migliore motilità post scongelamento e fertilità in vitro rispetto ad altri (Tada *et al.*, 1993) e questo permette di migliorare la resistenza dello spermatozoo alla crioconservazione (Shamsudding e Larsson, 1993; Watson, 2000).

Di solito nelle specie domestiche la quantità di cellule mobili nel seme scongelato dovrebbe essere intorno al 50% circa. Tuttavia il numero di spermatozoi motili per dose di inseminazione varia tra le specie. Nell'ariete per esempio il seme scongelato può avere un'alta percentuale (40-60%) di cellule mobili, sebbene solo 20-30% rimanga biologicamente funzionale; questo perché una cellula spermatica può essere mobile ma danneggiata, il che ne riduce comunque la fertilità (Medeiros *et al.*, 2002).

Il successo del congelamento del seme dipende anche da altri fattori, fra cui il grado di diluizione e il tipo extender. Originariamente la funzione del diluente era solo quella di proteggere gli spermatozoi durante il processo di refrigerazione e congelamento, in seguito si è data importanza anche al grado di diluizione per ragioni tecniche, cioè per la necessità di ottenere un numero maggiore di dosi inseminanti in modo da poter aumentare il numero di femmine da fecondare con un solo eiaculato oppure per standardizzare il numero di spermatozoi in ciascuna dose sia sul seme refrigerato che congelato.

Dopo la diluizione il seme viene refrigerato fino a temperature prossime a 0°C. Questa fase rappresenta un periodo in cui lo spermatozoo inizia ad adattarsi ad una riduzione del suo

metabolismo. Di solito l'equilibratura viene considerata come il tempo totale in cui gli spermatozoi rimangono in contatto con il glicerolo prima del congelamento, periodo durante il quale questo penetra nelle cellule spermatiche per stabilire un equilibrio fra la concentrazione intra ed extracellulare. Il termine "equilibratura" non deve essere trascurato, esso include la concentrazione di equilibrio non solo per il glicerolo ma anche per le altre componenti osmoticamente attive. Il glicerolo è stato implicato in diversi fenomeni indesiderabili che accorrono durante l'equilibratura, come i cambiamenti nella struttura, la modificazione dell'integrità biochimica dello spermatozoo e l'accelerazione della reazione acrosomiale. Sebbene questo possa essere trascurato alla luce delle altre proprietà crioprotettive del glicerolo, deve essere comunque messo in evidenza.

La velocità di raffreddamento fino a temperature prossime a 0°C può influenzare in maniera significativa la sopravvivenza dello spermatozoo dopo congelamento. Per il seme di ariete congelato in paillettes su vapori di azoto la velocità di raffreddamento viene regolata dalla distanza delle paillettes dal livello dell'azoto liquido. Gli spermatozoi di ariete tollerano bene vapori di azoto liquido fra -75°C e -125°C, mentre temperature al di sotto dei 55°C ne riducono la sopravvivenza (Colas, 1975). Per una discesa lineare della temperatura è meglio raffreddare il seme secondo una curva parabolica che può essere raggiunta sospendendo le paillettes 4-6 cm sopra la superficie dell'azoto liquido. Il recupero della motilità dopo scongelamento è risultato minore di quello ottenuto congelando il seme in pellets, anche se questo dato non si riflette sulla fertilità (Maxwell *et al.*, 1995).

Il congelamento in pellets di solito viene effettuato mettendo le goccioline di seme sopra piccole depressioni di ghiaccio secco su una piastra di polimero raffreddata a circa -80°C/-90°C. La velocità di raffreddamento può essere regolata dal volume dei pellets di seme e dalla temperatura dell'agente congelante. Tuttavia pellets con volumi da 0,03 a 0,86 ml, con differenti superfici di contatto, sono stati congelati in ghiaccio secco senza una riduzione della

motilità post scongelamento, sebbene la velocità di raffreddamento variasse (da 95 a 30°C/min) in funzione delle dimensioni dei pellets (Lighfoot e Salamon, 1969; Visser e Salamon, 1974). Velocità di raffreddamento maggiori, ottenute pellettando in una piastra di acciaio inossidabile o in ghiaccio secco raffreddato in azoto liquido (da -100°C a -160°C), non hanno influenzato il recupero della motilità degli spermatozoi (Salamon, 1970).

La collocazione del seme direttamente in azoto liquido ha mostrato invece scarsa motilità e morte degli spermatozoi post scongelamento. La ragione di questo è che l'azoto liquido non è un medium ideale per il congelamento veloce, perché essendo un liquido al suo punto di ebollizione ha un effetto riscaldante che ritarda il contatto termico col seme (Rey, 1957). Tuttavia, sia che il seme sia stato pipettato in goccioline (0,03 ml) in azoto liquido che caricato in paillettes (1.5-2.5 ml), immerse in azoto liquido per 5-7 secondi e poi sollevate e tenute sopra vapori di azoto per qualche minuto prima della re-immersione nello stesso, la motilità dopo scongelamento degli spermatozoi è risultata simile (Visser e Salamon, 1974).

1.3.4 SCONGELAMENTO DEL SEME

Nella procedura di congelamento e scongelamento la seconda fase è importante per la sopravvivenza degli spermatozoi tanto quanto la prima. Gli spermatozoi che sono sopravvissuti al congelamento a -196°C devono ancora affrontare la sfida dello scongelamento, attraversando due volte la zona critica di temperatura (da -15°C a -60°C).

Sia la velocità di congelamento che quella di scongelamento esercitano degli effetti sulla sopravvivenza degli spermatozoi (Mazur, 1985) dipendenti da due fattori, che la velocità di discesa termica sia stata abbastanza alta da indurre il congelamento intracellulare o abbastanza bassa da produrre la disidratazione cellulare. Nel primo caso è necessario uno scongelamento veloce per prevenire la ricristallizzazione di ogni cristallo di ghiaccio intracellulare presente nello spermatozoo. Spermatozoi scongelati ad alta velocità possono

anche essere esposti per un piccolo periodo di tempo al soluto concentrato e al crioprotettore (glicerolo) e in questo caso la reinstaurazione dell'equilibrio intra ed extracellulare è più rapida che per lo scongelamento lento.

Nella maggior parte dei lavori il seme di ariete congelato in pailletes viene scongelato in un bagnetto d'acqua a 37°C, in altri a 38-42°C. Alcuni invece hanno riportato che lo scongelamento ad alte temperature (60-70°C) era comparabile con quello a 38-42°C in termini di motilità post scongelamento, integrità acrosomiale e fertilità.

Il seme di ariete congelato in pellets può essere scongelato sia in una soluzione ("scongelamento bagnato") che in tubi a secco ("scongelamento secco"). Nel primo caso non solo la presenza, ma anche la composizione della soluzione di scongelamento influenza il recupero della motilità dello spermatozoo (es. zucchero-citrato-tuorlo d'uovo) (Lighfoot e Salamon, 1969b). Soluzioni a base di inositolo-citrato, glucosio-citrato e fruttosio sono risultate di uguale valore del diluente raffiniosio-citrato-tuorlo d'uovo per lo scongelamento a 37°C del seme congelato in pellets in un extender a base di raffiniosio-citrato-tuorlo d'uovo. Una relazione fra la composizione del diluente di congelamento e la soluzione di scongelamento è stata anche trovata usando un medium a base di tris (Salamon e Visser, 1972).

Temperature di scongelamento fra 37°C e 75°C sono state esaminate nel caso dello scongelamento per mezzo di una soluzione oppure di tubi a secco e generalmente miglioramenti nella motilità post scongelamento sono stati osservati con l'aumentare della temperatura. Al fine di mantenere i benefici di un'alta velocità di riscaldamento, senza il rischio di surriscaldare il seme, è stato raccomandato l'uso dello scongelamento interrotto oppure di speciali dispositivi di scongelamento. Nel primo caso, il seme sotto forma di pellets, messo in una soluzione calda di scongelamento (60-80°C), è stato trasferito in un bagno d'acqua a 35-40°C quando circa i due terzi del pellet erano sciolti (Smirnov *et al.*, 1978).

Questo sistema di scongelamento assicurava una veloce e continua separazione della parte liquida del pellet dalla rimanente parte solida, così da prevenire un ulteriore riscaldamento della porzione scongelata del pellet. I differenti tipi di scongelamento sono stati descritti da Salamon e Maxwell (1995).

1.4 LECITINA DI SOIA

L'utilizzo di medium definiti di origine non animale per la crioconservazione del seme è oggetto di numerosi studi (Fukui *et al.*, 2008; Thibier e Guerin, 2000; Jeyendran *et al.*, 2008). Come già detto il tuorlo d'uovo è il maggiore componente degli extenders per la crioconservazione del seme di molti mammiferi, inclusi il toro, l'ariete, il becco e il verro, per la sua azione protettiva sulle membrane cellulari contro lo shock da raffreddamento. La frazione crioprotettrice del tuorlo d'uovo è legata alle lipoproteine a bassa densità (LDL) (Moussa *et al.*, 2002; Jeyendran *et al.*, 2008; Watson e Martin, 1975). E' stato trovato che queste ultime, insieme alla lecitina, costituiscono le maggiori componenti del tuorlo d'uovo (Medeiros *et al.*, 2002, Moussa *et al.*, 2002), motivo per cui lo scienziato francese Maurice Goble, primo scopritore della lecitina nel 1850, l'ha nominata "lekithos", termine "verde" del tuorlo d'uovo. Essa è presente sia nelle cellule vegetali che animali e rappresenta un'importante fonte di fosfolipidi.

Malgrado il successo del tuorlo d'uovo sono stati riportati alcuni suoi svantaggi, fra cui il rischio di contaminazione batterica e la variabilità delle sue componenti, come sopra descritto (Aires *et al.*, 2003; Amirat *et al.*, 2004; Bousseau *et al.*, 1998; Fukui *et al.*, 2008). E' stato anche suggerito che esso possa ridurre la viabilità post scongelamento e l'integrità dell'acrosoma in molte specie quali l'ariete, il becco e il bufalo.

Dall'altro lato invece la lecitina di soia, combinazione di tre fosfolipidi naturali (fosfatidilcolina (PC), fosfatidil-etanol-amide (PE) e fosfo-tidil-inositolo (PI)), contiene anch'essa un'alta quantità di lipoproteine a bassa densità, ma a differenza del tuorlo è una componente nota che permette la produzione di un medium definito per la crioconservazione del seme, al fine di ovviare ai problemi legati alla variabilità di una componente animale come il tuorlo.

Diversi studi sono stati condotti per modificare gli extenders di congelamento del seme in

modo da proteggerlo durante il processo di crioconservazione (Gil *et al.*, 2003; Kukui *et al.*, 2008; Forouzanfar *et al.*, 2010) e in alcuni lavori sono stati usati anche extenders a base di lecitina commerciale (Sharafi *et al.*, 2009; De Paz *et al.*, 2010; Forouzanfar *et al.*, 2010).

1.5 COLESTEROLO

Il colesterolo gioca un ruolo importante in molte funzioni del seme, inclusa la stabilizzazione delle membrane cellulari alle basse temperature, per cui le specie che possiedono molto colesterolo nelle membrane risultano più resistenti allo shock da raffreddamento di quelle con poco colesterolo. Pertanto aumentare il contenuto di colesterolo presente nella membrana spermatica può essere una strategia per migliorare la qualità del seme dopo crioconservazione.

La membrana dello spermatozoo è composta da lipidi e proteine, con i lipidi disposti in un doppio strato in cui le teste idrofile sono rivolte verso la parte esterna della membrana e le catene idrofobe di acidi grassi verso la parte interna. I lipidi predominanti sono fosfolipidi e colesterolo. In aggiunta sono anche presenti proteine integrate e periferiche. L'associazione proteine-lipidi non è casuale e l'ambiente lipidico intorno alle proteine influenza le proprietà funzionali dell'unità aggregata, per cui alcuni lipidi vengono preferenzialmente raggruppati intorno a proteine integrali di membrana (Hammerstedt *et al.*, 1990). Alcune delle proteine fungono da pori o canali, mentre altre da recettori per diverse molecole. A temperatura ambiente la membrana si trova in uno stato fluido nel quale i fosfolipidi e le proteine possono muoversi lateralmente (Amann e Pickett, 1987). Quando le membrane vengono raffreddate, i fosfolipidi entrano in una fase di transizione passando dallo stato liquido allo stato cristallino-gel. Ciascuna specie di lipidi subisce questa fase ad un'unica temperatura, pertanto, essendo la membrana composta da differenti lipidi, essa sarà soggetta alla fase di transizione entro un range relativamente ampio di temperature. Nello stato di gel cristallino le catene idrofobiche di acidi grassi si raddrizzano e si allungano, rendendo la struttura della membrana più ordinata e limitando il movimento dei lipidi e delle proteine (Amann e Pickett, 1987; Hammerstedt *et al.*, 1990). Inoltre le proteine integrali sono escluse dai domini del gel cristallino all'interno della membrana, così molte interazioni lipidi-proteine vengono perse e queste ultime si

raggruppano nei domini rimanenti dei lipidi allo stato liquido. Come risultato dell'aggregazione delle proteine e della fase di transizione dei lipidi, le membrane diventano instabili e perdono la loro funzionalità (Amann e Pickett 1987).

La complessiva fluidità della membrana è data sia dal rapporto colesterolo-fosfolipidi che dal contenuto di catene idrofobiche di acidi grassi (Amann e Pickett 1987). Numerosi autori hanno osservato, studiano le differenti specie, che esse possono essere suddivise in tre grandi categorie in base alla resistenza del loro seme nei confronti dello shock da raffreddamento (Watson, 1981). Alcune specie infatti producono seme altamente suscettibile agli shock termici (verro, toro, ariete e stallone), altre sono meno sensibili (cane e gatto), altre ancora sono altamente resistenti (topo, pollo). In alcuni studi è stata valutata la differenza fra il seme delle diverse specie in base alla composizione delle membrane spermatiche ed è stato riscontrato che, in generale, gli spermatozoi provenienti da specie resistenti allo shock da raffreddamento presentano alti livelli di acidi grassi poliinsaturi e colesterolo nelle membrane (Watson, 1981).

Il rapporto colesterolo-fosfolipidi ha un ruolo fondamentale nel permettere la fluidità e la stabilità delle membrane alle basse temperature. Quest'azione è modulata attraverso l'interazione con le catene idrofobiche dei fosfolipidi (Watson, 1981) e si espleta col mantenimento dei fosfolipidi in una disposizione lamellare casuale al calare della temperatura (Amann e Pickett, 1987). Si è visto, in modelli di membrana, che aumentando il rapporto fra colesterolo e fosfolipidi si ha un allargamento della fase di transizione, si riduce la dispersione e la fase di separazione delle membrane (Drobnis *et al.*, 1993). Pertanto, trattare il seme con colesterolo prima della crioconservazione può ridurre la sensibilità della membrana ai danni da raffreddamento, eliminando o minimizzando la fase di separazione laterale delle membrane (Watson, 1981).

Il colesterolo è una molecola idrofobica non solubile nei diluenti utilizzati per il

congelamento del seme. Sono stati effettuati vari tentativi di solubilizzarlo incorporandolo in liposomi e addizionando questo complesso al seme. I risultati ottenuti con l'uso di queste tecniche sono stati variabili in relazione alle diverse specie animali (Parks *et al.*, 1981; Ollero *et al.*, 1996; Wilhelm *et al.*, 1996).

Recentemente sono state usate le ciclodestrine per inserire o rimuovere il colesterolo dalle membrane cellulari. Le ciclodestrine sono oligosaccaridi ciclici ottenuti dalla degradazione enzimatica dell'amido, e possiedono una faccia esterna idrofila e un nucleo interno idrofobo (Dobziuk, 2006), che può incapsulare composti idrofobici come il colesterolo e solubilizzarli. Queste molecole hanno un'alta affinità in vitro per gli steroli e sono molto efficienti nello stimolare la rimozione del colesterolo da molti tipi cellulari (Christian *et al.*, 1997), compresi gli spermatozoi (Companyo *et al.*, 2007; Visconti *et al.*, 1999). Inoltre se vengono precedentemente aggiunte al colesterolo sono in grado di inserirlo nelle membrane cellulari (Navratil *et al.*, 2003) e di trasferirlo in maniera più efficiente rispetto ad altri accettori di fosfolipidi (Zidovetzki e Levitan, 2007).

Si è visto inoltre che aggiungendo residui metilici o idrossipropilici alle ciclodestrine si migliora la loro solubilità in acqua e la loro abilità nel dissolvere composti idrofobici (Yancey *et al.*, 1996). E' stato sperimentato per esempio che le metil-beta-ciclodestrine e 2-idrossipropil-beta-ciclodestrine legano il colesterolo dei fibroblasti di topo meglio che le beta-ciclodestrine (Yancey *et al.*, 1996).

Le ciclodestrine si possono addizionare al colesterolo in differenti modi, fra cui aggiungendo gli ingredienti in un diluente acquoso seguito da sonificazione (Galantino, Homer *et al.*, 2006; Movassaghi *e al.*, 2009; Zeng e Terada, 2000) o diluendole in una miscela di metanolo-cloroformio seguito da essiccazione della soluzione per ottenere cristalli (Purdy e Graham, 2004a).

In generale le ciclodestrine più usate per trattare il seme per la crioconservazione sono le

metil-beta-ciclodestrine (MBC), oltre alle 2-idrossipropil-beta-ciclodestrine molto usate nell'ariete (Mocé *et al.*, 2010).

In aggiunta allo stress subito dagli spermatozoi durante la fase di transizione della membrana al decremento delle temperature, durante la crioconservazione essi vengono anche sottoposti a stress osmotici quando il crioprotettore presente nell'extender viene rimosso dalla cellula, durante quel momento in cui la soluzione extracellulare subisce cambiamenti di fase (Hammerstedt *et al.*, 1990). Lo spermatozoo risponde ai mutamenti osmotici contraendosi o rigonfiandosi e ripetute modificazioni nell'osmolarità della soluzione possono risultare in una perdita della sua integrità funzionale (Guthrie *et al.*, 2002). In aggiunta la risposta della cellula allo stress osmotico può essere letale se la contrazione o il rigonfiamento vanno oltre i suoi limiti di tolleranza osmotica, che sono specie dipendenti (Gilmore *et al.*, 1998).

La composizione dei diluenti, così come le modificazioni della membrana spermatica, possono alterarne la permeabilità (Gilmore *et al.*, 1998). Trattando il seme con CLC si ha una modificazione delle caratteristiche della membrana e questa a sua volta solleva il limite di tolleranza osmotica dello spermatozoo, indipendentemente dal fatto che la cellula sia sottoposta a condizioni ipo o iperosmotiche. L'aumento della tolleranza osmotica dello spermatozoo può essere un altro mezzo attraverso il quale il trattamento con CLC ne incrementa la criosopravvivenza.

Il colesterolo ha importanti effetti nell'organizzazione dei fosfolipidi della membrana, come è stato dimostrato in modelli di membrana (de Meyer e Smit, 2009). In questi il colesterolo può indurre una condensazione dei fosfolipidi che risulta in un aumento dello spessore e della disposizione del bi layer lipidico, portando la membrana da una fase fase liquida disordinata ad una fase liquida ordinata (de Meyer e Smith, 2009). Questa condensazione delle membrane, indotta dal colesterolo, determina una decrescita della permeabilità all'acqua in modelli di membrana e negli eritrociti (Muller *et al.*, 2008).

Nonostante ciò si è visto che il trattamento del seme con CLC incrementa la permeabilità delle membrane spermatiche ad alcuni crioprotettori come glicerolo e glicole etilenico (Glazar *et al.*, 2009) e di conseguenza non modifica il volume della cellula, perché la permeabilità all'acqua aumenta anch'essa (Glazar *et al.*, 2009). Tuttavia, da alcuni studi è emerso che, a temperature sotto lo zero, nel seme trattato con CLC e glicerolo, i parametri di permeabilità della membrana sono risultati simili sia nel campione trattato che nel controllo (Li *et al.*, 2006). La discrepanza fra questi studi può essere dovuta alle differenze fra specie, al modo in cui il seme è stato trattato con CLC, alle temperature di discesa termica e alle differenti metodologie usate per la raccolta dati e pertanto dovrebbero essere sottoposte a ulteriori studi.

Il colesterolo è implicato anche nella capacitazione. Una delle fasi iniziali della capacitazione dello spermatozoo è la perdita di colesterolo dalla membrana plasmatica, dopo la quale si susseguono una cascata di eventi che rendono lo spermatozoo capace di subire la reazione acrosomiale e fertilizzare l'oocita (Cross, 1998).

La crioconservazione induce danni allo spermatozoo che lo rendono meno reattivo all'ambiente circostante, mettendolo in un particolare stato di "crio-capacitazione" (Bailey *et al.*, 2000). È stato osservato che la crioconservazione induce perdita di colesterolo nel seme di verro (Cerolini *et al.*, 2001) e stallone (Moore *et al.*, 2005), che può essere considerata parzialmente responsabile di uno stato detto "di capacitazione" osservato nel seme crioconservato. Come indicato prima, trattando il seme con CLC si ottiene un incremento del contenuto di colesterolo, fino ad un livello elevato, che viene mantenuto anche dopo scongelamento. Pertanto è probabile che trattando il seme con CLC si abbia una modificazione dei patterns di capacitazione, che rendono lo spermatozoo capace di sottoporsi alla reazione acrosomiale. Il trattamento con CLC ritarda la capacitazione e i tempi della reazione acrosomiale nel seme fresco di toro (Purdy e Graham, 2004).

Per esempio è stato dimostrato che nel toro sia il seme crioconservato con CLC che il

controllo hanno subito la capacitazione e la reazione acrosomiale nello stesso tempo (Purdy e Graham, 2004), a differenza di quanto è stato osservato nel seme di stallone (Oliveira *et al.*, 2010; Spizziri *et al.*, 2010). Il fatto che il controllo e il seme trattato con CLC avrebbero subito capacitazione in maniera simile non era atteso, in quanto il quantitativo di colesterolo nel seme trattato con CLC era tre volte più alto del controllo (Purdy e Graham, 2004).

1.6 *TREALOSIO*

La membrana biologica è una componente chiave delle cellule e non deve essere lesa durante il processo di congelamento. L'acqua gioca un ruolo importante nel mantenimento della sua integrità strutturale e funzionale. Infatti la rimozione dell'acqua tramite disidratazione e successivo congelamento spesso esita in vaste alterazioni. Gli effetti dei danni da congelamento sulla fluidità della membrana cellulare sono stati messi in evidenza in diversi studi (Giraud *et al.*, 2000; Zeng e Terada, 2000; Ahn *et al.*, 2002). Tuttavia molti organismi esposti a queste condizioni accumulano composti che prevengono le modificazioni deleterie delle membrane durante gli stati di riduzione dell'acqua. Uno di questi composti è il trealosio, disaccaride normalmente trovato in alte concentrazioni in molti organismi capaci di sopravvivere alla completa disidratazione, fra cui anche lieviti e spore fungine (Sussman e Lingappa, 1959).

E' stato dimostrato, attraverso membrane artificiali, che il danno prodotto dalla fusione e dal rimescolamento di queste strutture durante il congelamento può essere ridotto attraverso l'utilizzo di diversi crioprotettori, fra cui appunto il trealosio, che secondo alcuni è risultato maggiormente protettivo del glicerolo (Anchoroguy *et al.*, 1987; Rudolph e Crowe, 1985, 1986).

I benefici effetti della supplementazione del seme con zuccheri sono stati riportati da numerosi studi (Garcia e Graham, 1989; Chen *et al.*, 1993; Storey *et al.*, 1998; Yildiz *et al.*, 2000; Aisen *et al.*, 2005) ed in particolare il trealosio è stato usato con successo per la crioconservazione del seme in molte specie di mammiferi, come l'ariete (Aisen *et al.*, 2002), il becco (Abloagla e Terada, 2003), il toro (Chen *et al.*, 1993; Woelders *et al.*, 1997), il topo (Sztejn *et al.*, 2001) e lo stallone (Squires *et al.*, 2004). I suoi effetti sono stati riportati anche nelle gazzelle (Garde *et al.*, 2003).

Sia in vivo che in vitro il trealosio protegge le strutture biologiche, come le proteine e le

membrane cellulari, dai danni causati dalla disidratazione e dagli shock termici prodotti dal processo di refrigerazione-congelamento. (Lins *et al.*, 2004). I benefici effetti sulla vitalità post scongelamento dopo addizione di trealosio all'extender sono stati riportati in numerosi lavori (Aisen *et al.*, 2000; Foote *et al.*, 1993; Molina *et al.*, 1994; Yildiz *et al.*, 2000; An *et al.*, 2000; Sztejn *et al.*, 2001).

Alcuni hanno ipotizzato che la diluizione del seme con trealosio prima del congelamento possa incrementare la fluidità delle membrane cellulari, rendendo lo spermatozoo capace di sopravvivere ai danni della crioconservazione.

Altre ricerche hanno messo in evidenza che quando aggiunto all'extender di congelamento il trealosio svolge alcune funzioni fondamentali: provvede a fornire un substrato energetico allo spermatozoo, mantiene la pressione osmotica del diluente, agisce come crioprotettore (Watson, 1979) e ha effetti stabilizzanti sia sulle proteine cellulari che sulle membrane. Sono state proposte tre ipotesi principali per spiegare i meccanismi biochimici che garantiscono gli effetti protettivi del trealosio sulle membrane: la sostituzione del legame idrogeno acqua-trealosio, la formazione di un sottile strato coperto da un film d'acqua e l'inibizione meccanica delle fluttuazioni conformazionali (Lins *et al.*, 2004).

Inoltre è stato suggerito (Anchordo-Guy *et al.*, 1987; Crowe *et al.*, 1994; Woelders *et al.*, 1997) che gli effetti crioprotettori del trealosio possono portare alla formazione di legami idrogeno fra il gruppo idrossile dello zucchero e la testa polare dei fosfolipidi di membrana (Woelders *et al.*, 1997; Crowe *et al.*, 1984), sostituendo le molecole d'acqua sotto disidratazione e aiutando a prevenire eventi di fusione delle membrane giustapposte (Bakàs e Di salvo, 1991).

E' concepibile che l'abilità del trealosio di inserirsi nel bi layer fosfolipidico possa modulare la fluidità delle membrane, rendendo le stesse più capaci di resistere al danneggiamento che deriva dal congelamento. Giraud *et al.* (2000) hanno riportato che il

tasso di recupero degli spermatozoi motili dopo congelamento e successivo scongelamento è superiore per gli spermatozoi che presentano un'alta fluidità della membrana prima del congelamento.

La relazione fra la fluidità delle membrane e l'adattamento alle basse temperature rimane tutt'oggi da studiare, tuttavia è noto che la stabilizzazione delle membrane biologiche durante il congelamento richiede la depressione delle temperature e il conseguente mantenimento dei lipidi costituenti in uno stato cristallino. Crowe *et al.* (1984) hanno concluso che, in presenza di trealosio, i lipidi disidratati hanno una temperatura di transizione simile a quella dei lipidi completamente idratati, mentre lipidi disidratati senza trealosio hanno un'alta temperatura di transizione. In base a questa evidenza si può dire che un incremento della fluidità della membrana potrebbe accrescere la depressione della temperatura di transizione delle stesse, permettendo alle membrane spermatiche di sopportare gli effetti delle basse temperature. Grazie ai suddetti meccanismi di questo zucchero le membrane appaiono meno vulnerabili ai rapidi cambiamenti morfologici che accorrono nella fase di disidratazione cellulare durante il congelamento (Woelder *et al.*, 1997).

Alcuni autori per testare il trealosio hanno utilizzato un extender ipertonico. Altri studi riportano che spermatozoi sottoposti a processi di osmoregolazione, in assenza di basse temperature, subiscono cambiamenti considerevoli nell'integrità della membrana plasmatica, dei lipidi e nella vitalità e motilità post scongelamento (Mayers 2005). È stato riportato che extenders con alta osmolarità causano un'inibizione della motilità dello spermatozoo che non può essere completamente reinstaurata tramite il ritorno a condizioni isosmotiche (Woelders *et al.*, 1997), suggerendo così che alcuni danni permanenti accorrono sia in condizioni di ipertonicità che in condizioni di ritorno all'isotonicità (Gao *et al.*, 1993). Come suggerito da Woelders *et al.* (1997) il fatto che la disidratazione dello spermatozoo in un medium ipertonico sia risultata più degradante che la disidratazione durante il congelamento potrebbe

essere dovuto al fatto che nel medium ipertonico le cellule devono sopportare la disidratazione a temperature prossime allo zero per un tempo abbastanza lungo. Pertanto è risultato preferibile utilizzare un extender isosmotico supplementato con trealosio, in modo che questo zucchero possa avere un effetto diretto sulla vitalità spermatica e sulla fertilità.

Ricerche recenti hanno messo in evidenza il ruolo benefico del trealosio nel proteggere la membrana dello spermatozoo nei piccoli ruminati (Aboagla e Terada, 2003, 2004; Aisen *et al.*, 2005). In particolare l'azione crioprotettiva sul seme di ariete è stata relazionata all'abilità di questo zucchero di prevenire l'integrità della membrana grazie ad un'azione antiossidante (Aisen *et al.*, 2005). Studi sui benefici effetti del trealosio sulla vitalità del seme di becco presenti in letteratura sono invece scarsi e poco confrontabili con le altre specie.

Inoltre il seme di becco presenta una particolarità rappresentata dai deleteri effetti del plasma seminale sulla vitalità dello spermatozoo durante la discesa termica, che ha reso necessari protocolli di congelamento che prevedono la preventiva centrifugazione del seme per l'eliminazione del plasma seminale e lo sviluppo di appropriati extenders di congelamento per questa specie. I fattori presenti nel plasma seminale di becco che interferiscono sulla congelabilità del seme in particolari condizioni sono:

- 1) Le interazioni negative fra i fosfolipidi del tuorlo d'uovo o del latte contenuti nell'extender e la secrezione delle ghiandole bulbo uretrali presenti nel plasma seminale (Leboueuf, 2000; Pundy, 2006);

- 2) La presenza di una molecola denominata EYCE (egg yolk coagulating enzyme), secreta dalle ghiandole bulbo uretrali, che determina coagulazione e morte degli spermatozoi quando il seme viene diluito con extender a base di tuorlo d'uovo. Questa è una fosfolipasi-A, che agisce come catalizzatore che idrolizza le lecitine del tuorlo d'uovo in acidi grassi e isolecitine tossiche per lo spermatozoo. Questa idrolisi stimola la reazione acrosomiale e la decondensazione della cromatina (Leboueuf, 2000; Pundy, 2006);

3) La presenza di una proteina secreta dalle ghiandole bulbo uretrali, la BUSgp60, che riduce la motilità e la vitalità del seme congelato con extender a base di latte (Nunes *et al.*, 1982). Questa è responsabile dell'idrolisi della membrana plasmatica e dei trigliceridi del latte, producendo acidi grassi (isolecitine dal tuorlo d'uovo e acido oleico dal latte) (Pellicer-Rubio-Combarrous, 1998).

1.7. MELATONINA

I piccoli ruminanti presentano caratteristiche riproduttive stagionali a fotoperiodo negativo, cioè al decrescere delle ore di luce incrementano la loro attività riproduttiva, per cui essi si accoppiano in autunno e la prole nasce in primavera.

I sistemi di allevamento e le tecnologie riproduttive hanno avuto una grande influenza sulla selezione artificiale e applicate al substrato ricettivo hanno favorito notevolmente la manipolazione dei cicli permettendo un allungamento della stagione riproduttiva (Hafez, 1952; Smith *et al.*, 1987).

Da studi effettuati sul seme di ariete è stato evidenziato che la sua crioconservabilità è maggiore durante la stagione estiva e autunnale, per cui questi periodi vengono utilizzati maggiormente per la raccolta del seme e il suo congelamento (Fiser e Fairfull, 1983; D'Alessandro *et al.*, 2003). La bassa qualità del seme in stagione non riproduttiva ne limita anche il suo utilizzo per le banche genetiche. La costituzione di banche di gameti ed embrioni offre la possibilità di salvaguardare genotipi attuali che potrebbero andare persi come conseguenza di inbreeding o deriva genica.

La possibilità di crioconservare il materiale seminale con elevata efficienza nel corso di tutto l'anno permetterebbe di preservare il patrimonio genetico. Attualmente le procedure di crioconservazione sono largamente dipendenti dal fotoperiodo. Da lavori effettuati sull'ovino domestico è stato messo in evidenza un notevole influsso della stagionalità non solo sulla vitalità ma anche sulla capacità fertilizzante degli spermatozoi considerati vitali dopo crioconservazione (Colas e Brice, 1976; Guerin *et al.*, 1992). Per migliorare la qualità del seme crioconservato durante la stagione non riproduttiva potrebbero essere adottate due strategie; la prima è quella di agire sulla fase di produzione degli spermatozoi mediante la modificazione artificiale del fotoperiodo degli animali con stabulazione controllata o tramite impianti di melatonina, la seconda è quella di intervenire durante le fasi di crioconservazione,

introducendo modificazioni dei mestruai diluitori in modo da minimizzare i danni derivanti dall'abbassamento crioscopico e proteggere così le strutture cellulari.

Negli ultimi anni sono emerse notizie circa i benefici effetti della melatonina nel proteggere gli spermatozoi da differenti tipi di ingiurie, fra cui quelle da crioconservazione. L'azione crioprotettiva della melatonina in molti tipi cellulari è stata spiegata attraverso i suoi ben noti effetti antiossidanti. Si è visto infatti che la melatonina neutralizza direttamente un alto numero di radicali liberi tossici (Tan *et al.*, 2007; Hardeland *et al.*, 2009; Peyrot e Ducrocq, 2008) e influenza l'espressione degli enzimi antiossidanti, incrementando l'RNA messaggero e i livelli di proteine in questi ultimi (Reiter *et al.*, 2000). Likewise, Sonmez *et al.* (2010) hanno riportato che la melatonina protegge lo spermatozoo di ratto dall'effetto avverso dell'agente periossidativo omocisteina.

Studi sul seme di toro (Bilodeau *et al.*, 2000; Chatterjee e Gagnon, 2001) e di stallone (Ball *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2009) hanno dimostrato che la crioconservazione è associata ad un'incrementata generazione di specie reattive all'ossigeno.

La diluizione del plasma seminale, un'importante fonte di antiossidanti, predispone il seme crioconservato a stress ossidativi, come mostrato nel toro (Bilodeau *et al.*, 2000). L'eccessiva produzione di ROS può avere serie implicazioni nella struttura e nella funzionalità dello spermatozoo, essendo questa cellula particolarmente suscettibile ai danni da questi indotti (Saleh e Agarwal, 2002). Per queste ragioni, numerosi antiossidanti esogeni sono stati inclusi nell'extender di congelamento e la loro capacità di incrementare la qualità del seme dopo scongelamento è stata riportata in diversi studi (Bilodeau *et al.*, 2000; Roca *et al.*, 2005; Berlinguer *et al.*, 2003), fornendo così una prova diretta che lo stress ossidativo durante la crioconservazione nuoce alle cellule spermatiche.

L'aggiunta di melatonina all'extender di congelamento mitiga la severa riduzione dei livelli di ATP intracellulare associato al processo di crioconservazione (Berlinguer *et al.*,

2010; Madeddu *et al.*, 2010). Come riassunto da Leon *et al.* (2005) la melatonina esercita un'azione protettiva sui mitocondri, che può essere mediata tramite diversi meccanismi; primo la proprietà antiossidante e la capacità di eliminare i radicali liberi delle indolamine proteggono gli organelli dal danno ossidativo (Martin *et al.*, 2000); secondo la melatonina incrementa l'attività del complesso I e IV della catena di trasporto di elettroni, aumentando così la respirazione mitocondriale e la sintesi di ATP sotto condizioni normali o stressanti (Acuna-Castroviejo *et al.*, 2002). E' stato anche visto che la melatonina è in grado di proteggere i mitocondri da danni ossidativi riducendo il consumo di ossigeno, il potenziale di membrana e la produzioni di anioni superossidi, mentre mantiene la produzione di ATP (Lopez *et al.*, 2009). Ciò assume notevole importanza se si considera che nel seme l'ATP supporta molteplici attività cellulari ed eventi biochimici necessari per un'efficiente capacità fecondante, quali la capacitazione e la reazione acrosomiale (Miki, 2007).

Pertanto l'azione protettiva esercitata dalla melatonina durante la crioconservazione del seme risulta relazionata al suo effetto antiossidante, che agisce su diversi parametri di qualità: vitalità, motilità (Gwayi e Bernard, 2008), concentrazione di ATP e integrità del DNA (Succu *et al.*, 2011). Come riportato di recente l'integrità del DNA rappresenta un importante parametro nella valutazione della funzionalità del seme dopo congelamento (Berlinguer *et al.*, 2009) ed è stato altresì dimostrato che la crioconservazione induce il danneggiamento del DNA nell'ariete (Peris *et al.*, 2004) e nel verro (Fraser e Strzezek, 2005). Esiste una sostanziale evidenza dell'effetto protettivo della melatonina e del suo metabolismo contro modificazioni ossidative e nitrosative del DNA, risultato di un processo, endogeno ed esogeno, di formazione di radicali liberi (Hardeland *et al.*, 2009; Reiter *et al.*, 2009; Laothong *et al.*, 2010). Il grado di danneggiamento del DNA in seguito a crioconservazione può essere valutato tramite un metodo altamente sensibile come la Comet (Comet assay).

1.8. ANTIOSSIDANTI

1.8.1 STRESS OSSIDATIVO E SUOI EFFETTI SULLA FERTILITA' DEL SEME

La sopravvivenza degli organismi aerobi in un ambiente ricco di ossigeno richiede una complicata interazione tra la produzione di radicali liberi e la capacità degli organismi di controllare tali molecole. In condizioni normali la produzione di radicali liberi è bassa ed è bilanciata dall'azione dei sistemi di difesa antiossidante. In diverse condizioni fisiopatologiche, però, la velocità di produzione dei radicali liberi supera la capacità dei sistemi di difesa cellulare, per cui insorge una condizione nota come stress ossidativo (Sies, 1991).

Lo stress ossidativo è quindi dovuto ad uno squilibrio nel bilancio tra pro-ossidanti e antiossidanti in favore dei primi e porta inevitabilmente a un danno ossidativo (Almeida e Ball, 2005; Kumar *et al.* 2006). I radicali a maggiore diffusione sono rappresentati dai ROS, specie reattive dell'ossigeno, che si formano nell'organismo come sottoprodotto del normale metabolismo aerobico. I più importanti ROS sono l'anione superossido O_2^- , il perossido d'idrogeno H_2O_2 e il radicale ossidrilico $\bullet OH$ (Andrabi *et al.*, 2008). Gli effetti dell'accumulo di ROS sono principalmente tre:

1) Perossidazione lipidica delle membrane: danno a carico dei doppi legami degli acidi grassi insaturi con la formazione di perossidi, sostanze molto instabili e reattive che inducono una reazione a catena autocatalitica;

2) Alterazioni ossidative a carico delle proteine: ossidazione delle catene laterali degli aminoacidi, formazione di legami crociati proteine-proteine e frammentazioni della catena proteica;

3) Danni al DNA: formazione di legami crociati, sostituzione di basi e rottura di porzioni di filamenti (Baumber *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2006).

E' stata dimostrata un'associazione tra il danno ossidativo e la crioconservazione essendo

essa stessa una causa della produzione eccessiva di ROS (Breininger *et al.*, 2005), che di conseguenza è stata associata alla diminuzione della motilità dello spermatozoo, alla sua ridotta capacità di penetrare l'oocita e all'infertilità (Baumber *et al.*, 2002; Andrabi *et al.*, 2008; Breininger *et al.*, 2005; Micheal *et al.*, 2007).

L'azione ossidativa a carico dei lipidi procede con un meccanismo radicalico a catena definito lipoperossidazione. I principali bersagli di questo fenomeno sono gli acidi grassi poliinsaturi, che sono presenti in elevate concentrazioni nei fosfolipidi delle membrane cellulari. Il perossido d'idrogeno è una specie radicale molto reattiva e un potente iniziatore della perossidazione lipidica (Baumber *et al.*, 2003). Questo è considerato la specie più tossica a causa della sua capacità di attraversare facilmente e rapidamente le membrane e di inibire le attività enzimatiche e le funzioni cellulari (Neild *et al.*, 2005).

Nell'eiaculato di toro, topo e coniglio i radicali dell'ossigeno vengono prodotti dagli spermatozoi stessi e dai leucociti eventualmente presenti (Baumber, 2003; Neild *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2000), per cui si può ipotizzare che, essendo il plasma seminale un'importante fonte di sostanze antiossidanti, la sua eliminazione metta il seme in una condizione di maggiore vulnerabilità agli effetti tossici dei ROS (Baumber *et al.*, 2002; Neild *et al.*, 2005). Le cellule scongelate si sono rivelate più sensibili all'ossidazione rispetto a quelle non congelate, perché lo stesso grado di ossidazione viene raggiunto a concentrazioni di ROS inferiori (Neild *et al.*, 2005). Ciò può essere dovuto all'eliminazione del plasma seminale, previsto per esempio in alcuni protocolli di congelamento per la specie caprina (Eiman *et al.*, 2003) che riduce di molto le risorse antiossidanti naturali del seme (Baumber *et al.*, 2002; Neild *et al.*, 2005).

La regione della membrana spermatica più colpita dall'aumentare della quantità di specie reattive sembra essere quella centrale (mid piece) e di seguito le restanti parti, ad eccezione solo della membrana acrosomiale. La maggiore sensibilità della regione centrale è legata al

fatto che in essa sono presenti i mitocondri dello spermatozoo, che la rendono quindi più ricca di ossigeno e dei suoi derivati (Neild *et al.*, 2005).

Il danno ai fosfolipidi causa un aumento della permeabilità di membrana con perdita dell'equilibrio osmotico ed elettrolitico (aumento intracellulare di Na⁺ e di Ca²⁺ e riduzione intracellulare di K⁺) (Mantovani *et al.*, 2002). Esso può causare anche la distruzione diretta o l'inattivazione di enzimi (per ossidazione delle proteine), in particolar modo degli enzimi acrosomiali, alterazioni a carico del citoscheletro e dell'assonema (De Lamirande e Gagnon, 1992) e danno al DNA (Breininger *et al.*, 2005).

La perossidazione lipidica è stata associata a reazioni acrosomiali anomale e alla perdita della fluidità di membrana con riduzione della motilità e del potenziale di fertilizzazione degli spermatozoi (Almeida e Ball, 2005). Mentre la perdita di vitalità delle cellule spermatiche è stata osservata solo a concentrazioni molto elevate di perossidi, si è visto che la motilità viene inibita anche solo da aumenti progressivi della perossidazione lipidica delle membrane, indotta dal perossido d'idrogeno (Neild *et al.*, 2005). Pertanto alcuni ricercatori (Baumber *et al.*, 2002) hanno ipotizzato che la motilità sia un parametro più sensibile della vitalità, dell'integrità acrosomiale e del potenziale di membrana mitocondriale (Neild *et al.*, 2005).

Gli effetti causati dalle specie reattive dell'ossigeno dipendono dalla loro natura, quantità, momento e durata dell'esposizione (Neild *et al.*, 2005). La produzione controllata di ROS da parte degli spermatozoi ha una funzione di controllo e di mediatore di eventi fisiologici come la capacitazione, la reazione acrosomiale e la fusione oocita-spermatozoo (Almeida e Ball, 2005; Neild *et al.*, 2005; Golas *et al.*, 2010; Bailey *et al.*, 2000); per cui lo scopo dell'eventuale aggiunta di antiossidanti non deve essere quello di eliminare completamente le specie reattive, ma quello di mantenerle a livelli fisiologici (Michael *et al.*, 2007). Una quantità eccessiva di ROS, invece, è tossica per la cellula spermatica e può essere dovuta alla deplezione o all'inefficienza dei meccanismi di controllo enzimatici, alla presenza di troppi

spermatozoi difettosi e danneggiati o di leucociti nel materiale seminale (Baumber *et al.*, 2003; Baumber *et al.*, 2002; Pagl *et al.*, 2006).

L'ossidazione dei gruppi SH (tioli) delle proteine è stata associata all'inibizione della motilità e della capacità fecondante (fusione delle membrane e penetrazione nell'ocita) (Khalifa e Waheed, 2006; Bailey *et al.*, 2000), ma si è visto che l'aggiunta dei tioli nel diluente ha peggiorato la motilità spermatica del seme congelato di bovino (Michael, 2007).

Il danno al DNA da parte delle specie reattive dell'ossigeno avviene molto prima di qualsiasi alterazione visibile nella fusione spermatozoo-ocita o nella motilità e consiste nella formazione di nuovi legami (cross-linking), nella frammentazione e nello scambio di basi della sequenza genica (Baumber *et al.*, 2003).

In conclusione, la sensibilità degli spermatozoi al danno ossidativo è da attribuire all'elevata concentrazione di acidi grassi insaturi presenti nelle membrane cellulari, alla quasi completa dipendenza dal metabolismo aerobico per la produzione di ATP (e quindi formazione di radicali nei mitocondri), alle ridotte difese antiossidanti, all'incapacità di riparare i danni cellulari dovuta al blocco della trascrizione genica e alla produzione di ROS da parte degli spermatozoi stessi (Almeida e Ball, 2005; Khalifa e Waheed, 2006).

Alcuni fattori possono incrementare lo stato ossidativo delle cellule durante la loro crioconservazione: il rapporto di diluizione, la disponibilità di ossigeno durante la lavorazione del seme, la presenza di molti spermatozoi morti, danneggiati, immaturi o di leucociti, la centrifugazione e l'asportazione del plasma seminale, l'eccessivo ingresso di Ca^{2+} nella cellula, soprattutto con diluitori a base di latte (il Ca^{2+} favorisce la produzione di H_2O_2 e la capacitazione prematura) e la riduzione delle difese antiossidanti nel seme diluito con diluitori a base di tuorlo d'uovo (Khalifa e Waheed, 2006).

1.8.2 ANTIOSSIDANTI

Gli antiossidanti sono composti in grado di proteggere le cellule dai danni provocati dall'ossidazione indotta da radicali. (Neild *et al.*, 2005; Golas *et al.*, 2010).

Gli antiossidanti sono presenti all'interno della cellula e nell'ambiente circostante e possono essere classificati in funzione del loro meccanismo d'azione. Quelli che prevengono la formazione dei radicali e che quindi riducono i danni in modo indiretto, vengono detti "antiossidanti preventivi", essi infatti possono inibire enzimi pro-ossidanti che producono radicali, chelare ioni di metalli di transizione essenziali per la reazione di ossidazione (Fe^{2+} e Cu^+) oppure neutralizzare i radicali stessi. Quelli che invece agiscono direttamente vengono detti "free radical scavenger" (Yu, 1994) e sono per la maggior parte antiossidanti di tipo chainbreaking, per la loro capacità di interrompere la catena di reazione di propagazione dei radicali.

Inoltre gli antiossidanti si possono classificare in enzimatici e non enzimatici. Fra i primi si annoverano la glutatione perossidasi (riduce il glutatione), la glutatione ossidasi, la superossido dismutasi (converte l'anione superossido a perossido d'idrogeno) e la catalasi (converte il perossido d'idrogeno ad acqua); i metalli di transizione quali ferro e rame che, quando incorporati nelle proteine, limitano la produzione di ROS e infine altre sostanze antiossidanti come acido piruvico, acido ferulico, albumina, taurina. Fra gli antiossidanti non enzimatici sono compresi il glutatione, la vitamina C (acido ascorbico), la vitamina E (tocotrienoli α , β , γ e δ e tocoferoli α , β , γ e δ) e la vitamina A. Alcuni studi hanno messo in evidenza la presenza nel plasma seminale di sostanze come l'ergotioneina e la glicerilfosforilcolina, che si sono dimostrate in grado di ridurre la lipoperossidazione (Nield *et al.*, 2005).

La catalasi è l'enzima antiossidante d'elezione nella protezione della cellula dalle specie reattive (Baumber *et al.*, 2003; Nield *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2007; De Lamirande e

Gagnon, 1992) che, se aggiunto nel diluente, ha dimostrato il buon effetto protettivo sui parametri qualitativi del seme scongelato di cane (Michael *et al.*, 2007). L'albumina è una proteina extracellulare ad azione antiossidante in grado di legare gli ioni Fe^{2+} e Cu^{+} riducendo la formazione dell'anione perossido (Kalifa e Waheed, 2006). La taurina è considerata una molecola importante per la motilità e la fertilità spermatica e gioca un ruolo di rilievo anche nella regolazione osmotica e nell'equilibrio ionico (Michael *et al.*, 2007). L'acido piruvico è un potente scavenger del perossido d'idrogeno e aggiunto nel seme bovino diluito con tuorlo d'uovo e congelato o diluito con diluitori a base di latte e refrigerato, ha migliorato i valori della motilità e del contenuto di ATP (Khalifa e Waheed, 2006).

2. SCOPO DELLA TESI

La presente tesi di dottorato si inserisce in un programma generale di attività di ricerca che la sezione di Fisiologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria porta avanti da diversi anni sui meccanismi che sono alla base dei processi riproduttivi di diverse specie domestiche, attraverso l'impiego di modelli sia in vivo che in vitro.

In considerazione degli svantaggi dell'utilizzo del tuorlo d'uovo come componente animale, descritti nella parte generale, in questo lavoro si è voluta saggiare l'efficacia dell'aggiunta di alcune sostanze sostitutive nell'extender di congelamento, al fine di sviluppare un sistema definito per la crioconservazione del seme di becco di razza sarda.

Il tuorlo d'uovo rappresenta il più importante crioprotettore utilizzato per gli extenders di congelamento del seme di numerose specie animali. La sua azione protettiva contro i danni derivati dall'abbassamento delle temperature è data dalle lipoproteine a bassa densità in esso presenti (LDL - Low density Lipoproteins), che sono considerate le migliori molecole con capacità crioprotettiva.

Tuttavia, in considerazione del fatto che il tuorlo d'uovo è una componente animale, soggetta pertanto ad un'ampia variabilità dei suoi costituenti, sono sorti dei dubbi circa la sua effettiva efficienza e sui vantaggi del suo utilizzo.

Il tuorlo d'uovo infatti è soggetto a contaminazione batterica che può rappresentare un rischio sanitario nell'inseminazione artificiale; non è pronto per l'uso in quanto deve essere accuratamente separato dalla sua membrana e dall'albume; la sua composizione lipidica è soggetta ad un'ampia variabilità in funzione della dieta e delle condizioni di vita della gallina; inoltre secondo alcuni può avere un'azione meccanica che rallenta il movimento degli spermatozoi e un effetto che inibisce la loro respirazione (Kampschmidt *et al.*, 1953; Watson e Martin, 1975). Tuttavia trovare sostanze alternative al tuorlo d'uovo non è semplice perché

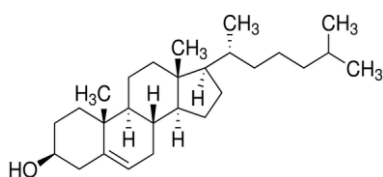
il preciso meccanismo attraverso il quale questo protegge lo spermatozoo durante il congelamento, rimane ancora poco compreso.

Nel presente lavoro sono state condotte diverse prove di congelamento del seme di becco utilizzando alcune sostanze definite, che per le loro proprietà potrebbero essere sostitutive al tuorlo d'uovo. Queste sono:

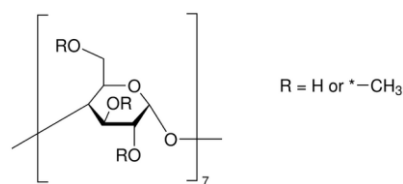
1) Lecitina di soia: rappresenta un'importante fonte di fosfolipidi naturali (fosfatidilcolina (PC), fosfatidil-etanol-amide (PE) e fosfo-tidil-inositolo (PI)) e contiene anch'essa un'alta quantità di lipoproteine a bassa densità, ma a differenza del tuorlo è una componente nota reperibile commercialmente.

2) Colesterolo: il rapporto colesterolo-fosfolipidi ha un ruolo fondamentale nel garantire la fluidità e la stabilità delle membrane cellulari alle basse temperature, pertanto aumentare il contenuto di colesterolo nella membrana spermatica può essere una strategia per migliorare la qualità del seme dopo crioconservazione.

Il colesterolo è una molecola idrofobica non solubile nei diluenti utilizzati per il congelamento del seme, ma recentemente sono state usate le ciclodestrine per inserirlo e rimuoverlo dalle membrane cellulari. Il colesterolo utilizzato in questo lavoro è una molecola già solubilizzata con le metil-beta-ciclodestrine, reperibile commercialmente.



Formula del colesterolo

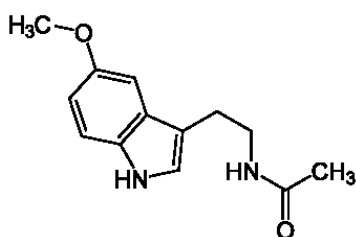


Metil-beta-ciclodestrine

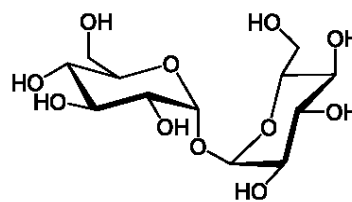
3) Trealosio: è un disaccaride, crioprotettore non permeabile. Sia in vivo che in vitro protegge le membrane cellulari dai danni causati dalla disidratazione e dagli shock termici

prodotti dal processo di refrigerazione-congelamento e modula la fluidità delle membrane. Inoltre sembra avere un'azione antiossidante. La presenza di trealosio in associazione col glicerolo, altro crioprotettore con diversa modalità d'azione, potrebbe garantire maggiori percentuali di sopravvivenza allo scongelamento.

4) Melatonina: l'azione crioprotettiva della melatonina durante la crioconservazione del seme risulta relazionata al suo effetto antiossidante, che neutralizza un alto numero di radicali liberi tossici (Tan *et al.*, 2007; Hardeland *et al.*, 2009; Peyrot e Ducrocq, 2008) e influenza l'espressione degli enzimi antiossidanti. Questo effetto si ripercuote positivamente sui diversi parametri di qualità: vitalità, motilità (Gwayi e Bernard, 2008), concentrazione di ATP e integrità del DNA.



Melatonina



Trealosio

Inoltre, partendo dal presupposto che la crioconservazione induce sulla cellula spermatica uno stress ossidativo dovuto alla produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno), cui segue lipoperossidazione a carico dei lipidi della membrana plasmatica, sono stati effettuati i seguenti dosaggi sull'estratto cellulare post congelamento:

1) Capacità antiossidante totale: è un dosaggio basato sull'impiego di un radicale, l'ABTS, che viene scavengerizzato tanto velocemente quanto più antiossidanti sono presenti nel campione. Permette la misurazione di sostanze antiossidanti nei liquidi o negli estratti biologici.

2) Concentrazione dei tioli totali e del glutazione: i tioli sono dei composti che

contengono un gruppo tiolico (-SH) legato ad un atomo di carbonio e che presentano proprietà antiossidanti. Esempi di comuni tioli sono la cisteina, l'omocisteina, la N-acetilcisteina (NAC) e il GSH. Il glutathione (GSH), antiossidante idrosolubile, è il più abbondante tiolo a basso peso molecolare presente nelle cellule dei mammiferi. E' coinvolto in molti processi fra cui il mantenimento del bilancio ossidoreduztivo intracellulare (Jacob *et al.*, 2003) e la sua funzione antiossidante sembra essere strettamente legata al suo gruppo tiolico. Il GSH protegge i tessuti dai danni provocati dai radicali in maniera diretta, ossia reagendo con le specie radicaliche, oppure in modo indiretto, mantenendo nella forma ridotta sia i gruppi sulfidrilici delle proteine che di alcuni antiossidanti (Yu, 1994). E' stato dimostrato per esempio che il GSH mantiene la normale distribuzione dei gruppi sulfidrilici delle proteine di membrana dello spermatozoo di toro durante il processo di congelamento-scongelo (Chatterjee *et al.*, 2001).

I dosaggi di questi antiossidanti sono stati effettuati per confrontare le eventuali differenze presenti a seguito dell'aggiunta delle sostanze sopra elencate nell'extender di congelamento, al fine di valutare se i diversi mestruai diluitori utilizzati potevano contrastare gli stress ossidativi indotti dalla crioconservazione.

In questo lavoro sono stati presi in considerazione come parametri di valutazione della qualità del seme dopo scongelamento (a seguito dell'utilizzo dei diversi extenders) i seguenti: la vitalità spermatica (intesa come rapporto cellule vive/morte), la percentuale di spermatozoi motili progressivi e rapidi (tramite analisi computerizzata CASA), i livelli intracellulari di ATP, il grado di frammentazione del DNA tramite metodica Comet assay, la capacità fecondante tramite la fecondazione eterologa e lo stato ossidativo.

3. MATERIALI E METODI

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

3.1 *PRELIEVO DEL MATERIALE SEMINALE E VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' SPERMATICA SUL SEME FRESCO*

Per le nostre prove è stato utilizzato un pool di seme prelevato da cinque becchi adulti di razza sarda, di provata fertilità, di età compresa fra 5 ed 7 anni ed un peso di 38-45 Kg, addestrati al salto in vagina artificiale utilizzando in una prima fase delle capre in estro e successivamente femmine non in estro. Gli animali vivono negli stabulari della sezione di Fisiologia del Dipartimento, ricevono un'alimentazione costituita da fieno di prato stabile con un'integrazione di 300 gr. di un concentrato commerciale.

Il campione di seme dopo prelievo è stato trasportato in laboratorio nell'arco di venti minuti e sottoposto alle seguenti valutazioni: volume (mediante micropipetta graduata), motilità di massa (valutazione soggettiva su scala da 1 a 5), vitalità (tramite striscio su vetrino colorato con eosina-nigrosina) (Pintado *et al.*, 2000), parametri di motilità con metodica CASA (computer assisted sperm analyzer), concentrazione (spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 540 nm, in riferimento ad una curva standar a concentrazioni note di seme), estrazione e dosaggio dell'ATP intracellulare (metodo enzimatico).



Immagine 1: Becco di razza sarda



Immagine 2. Prelievo del materiale seminale tramite vagina artificiale.

3.1.1 Vitalità spermatica

La colorazione per la vitalità prevede l'utilizzo di un colorante, l'eosina nigrosina, in grado di identificare le cellule spermatiche morte e quelle con soluzioni di continuo a livello della membrana che riveste il cappuccio acrosomiale.

La vitalità, intesa come rapporto cellule vive/morte, è stata valutata mediante colorazione col colorante suddetto che, non passando le membrane delle cellule ancora vitali, colora in rosso solo gli spermatozoi morti, mentre la bassa permeabilità degli spermatozoi vivi impedisce la penetrazione dell'eosina e perciò mantiene la colorazione biancastra della testa. La presenza della nigrosina assicura un adeguato contrasto del preparato (Chalah e Brilland, 1998).

Per procedere all'analisi 1 μ l del materiale seminale è stato sospeso in 200/400 μ l di PBS per ottenere una concentrazione di 25×10^6 spermatozoi/ml; 5 μ l di questa soluzione sono stati addizionati a 10 μ l di eosina-nigrosina, depositati su un vetrino, lasciati a miscelare per

30 secondi, strisciati con un coprioggetto e fatti asciugare per 10 minuti. Ogni campione è stato analizzato in doppio contando al microscopio Diaphon (Nikon) almeno 200 spermatozoi per ogni vetrino.



Immagine 3. Esempio di spermatozoi colorati con eosina-nigrosina.

3.1.2 *Motilità spermatica*

Un'altra aliquota della diluizione preparata per la vitalità è stata destinata alla valutazione della motilità mediante analisi computerizzata (CASA). Dieci microlitri di campione diluito sono stati quindi posizionati in una camera di Makler su un microscopio con piano riscaldato a 38°C e la motilità spermatica analizzata da un analizzatore di motilità computerizzato (CASA, Computer Assisted Sperm Analysis, v 3.2.0 Microptics S.L., Barcellona, Spagna). Sono stati analizzati 5 campi (200 spermatozoi per campo) per campione. I parametri della motilità presi in esame sono stati i motili progressivi e i rapidi.

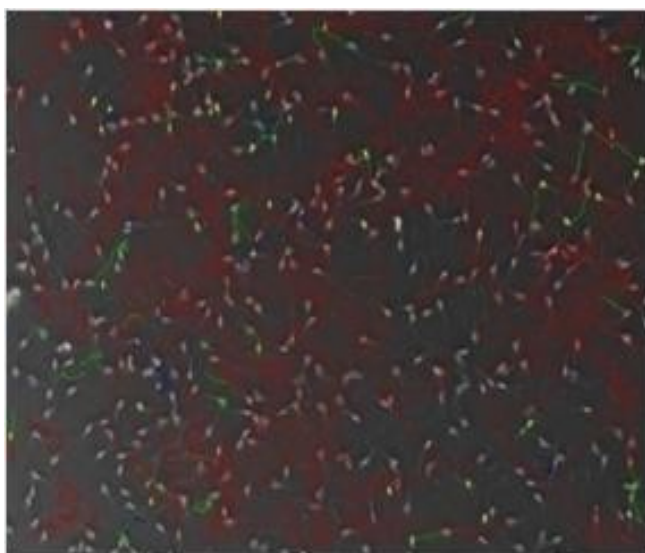


Immagine 4. Esempio di schermata CASA

3.1.3 Estrazione e dosaggio dell'ATP intracellulare

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

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

3.1.4 *Analisi statistiche*

I risultati della vitalità, della motilità progressiva spermatica, dei rapidi e dell'ATP sono stati analizzati con ANOVA unidirezionale e sono espressi con la media \pm SD. Le analisi statistiche sono state condotte usando il software di statistica Statgraphic Centurion XV (versione 15.2.06 per Windows; Stat Point, Inc., Herndon, VA, USA) e la probabilità di $P \leq 0,05$ è stata considerata come livello minimo di significatività.

3.2 *METODICHE DI CONGELAMENTO*

Il congelamento del seme è stato esaguito in accordo col metodo descritto da Berlinguer *et al* (2009). Per la rimozione del plasma seminale il pool di seme è stato sottoposto a doppia centrifugazione a 1500 rpm per 20' a 27° C, previa diluizione in 10 ml di extender e successiva rimozione del surnatante per entrambe le centrifugate. L'extender è stato preparato secondo la seguente ricetta: Tris 375 mM; acido citrico 124 mM; fruttosio 41 mM; penicillina 0,1% e streptomina 0,1%. Il pellet ottenuto dalle due centrifughe è stato suddiviso nelle diverse aliquote, in base al protocollo sperimentale, diluite nel rapporto di 1:5 con i differenti extenders. Nella prima fase sono stati aggiunti alle aliquote di seme i primi $\frac{3}{4}$ di extender e posti in un bagnetto contenente 300 ml di acqua alla temperatura di 27° C. La curva di refrigerazione prevede la discesa termica da 27° a 4° C nel tempo di circa 2 ore.

Una volta raggiunta la temperatura è stata aggiunta l'ultima parte di mestruo contenente il glicerolo in modo da ottenere una concentrazione spermatica finale di 400×10^6 spermatozoi/ml ed una concentrazione finale di glicerolo del 4%. Dopo 20 minuti di equilibratura in glicerolo alla temperatura di 4° C, è stato effettuato il congelamento in pellets utilizzando una base di CO₂ solida, che possiede una temperatura di -80° C, sulla quale sono stati scavati degli alloggiamenti semiconcavi di circa $\frac{1}{2}$ centimetro di diametro.

Aliquote di 250 μ l di seme sono state poste negli incavi e lasciate per 2 min., fino al totale congelamento, e quindi tuffate direttamente in azoto liquido (-196°C).



Immagine 5. Esempio di una base di CO₂ solida.

3.3 *DISEGNO SPERIMENTALE*

Il presente lavoro è stato condotto con lo scopo di sviluppare un sistema definito per la crioconservazione del seme di becco di razza sarda tramite utilizzo di sostanze alternative al tuorlo d'uovo. Sono state effettuate diverse prove secondo il protocollo sperimentale descritto di seguito.

3.3.1 *1° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL TREALOSIO ADDIZIONATO ALL'EXTENDER BASE SENZA TUORLO*

Sulla base dei dati presenti in letteratura circa i benefici effetti crioprotettivi della supplementazione dell'extender di crioconservazione del seme con trealosio, è stata effettuata una prova di congelamento, senza utilizzo del tuorlo d'uovo e con la sola aggiunta di diverse concentrazioni di trealosio. Una soluzione madre di trealosio (320 mM) in acqua milliQ è stata addizionata all'extender base al fine di ottenere i seguenti gruppi :

-EXT: extender base (controllo);

-T 25%: 75% della soluzione extender + 25% della soluzione di trealosio v/v (0,080 mM);

-T 50%: 50% della soluzione extender + 50% della soluzione di trealosio v/v (0,187 mM);

-T 75%: 25% della soluzione extender + 75% della soluzione di trealosio v/v (0,281 mM);

-T 100%: solo soluzione di trealosio (0,320 mM).

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità regolata su 0,380-0,385 OSM/kg.

3.3.2 2° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA MELATONINA ADDIZIONATA ALL'EXTENDER CON TUORLO

In considerazione dei risultati ottenuti in un lavoro effettuato nel nostro laboratorio sui benefici effetti dell'addizione di melatonina come antiossidante all'extender di congelamento per il seme di ariete (Succu *et al.*, 2011), sono state provate le stesse concentrazioni usate nel suddetto lavoro per valutare l'eventuale concentrazione migliore nel becco.

E' stato preparato uno stock di melatonina disciolta in DMSO e PBS, come descritto da Ishizuka *et al.* (2000); in seguito è stata fatta una prediluizione in extender base a diverse concentrazioni al fine di aggiungere sempre lo stesso volume di prediluito alla soluzione finale. La prediluizione è stata addizionata sia all'extender base che all'extender base al 20 % di tuorlo d'uovo (v/v), per raggiungere le concentrazioni finali di 0,1 mM, 1 mM, 10 mM (la concentrazione finale di DMSO in tutti i campioni era di 0,1% e il DMSO è stato incluso anche nel controllo). Sono stati ottenuti i differenti extenders:

-EXT T: extender base + tuorlo d'uovo 20%;

-EXT T M 0,1: extender tuorlo + melatonina 0,1 mM;

- EXT T M 1: extender tuorlo + melatonina 1 mM;
- EXT T M 10: extender tuorlo + melatonina 10 mM;
- EXT: extender base (controllo);
- EXT M 0,1: extender sine tuorlo + melatonina 0,1 mM;
- EXT M 1: extender sine tuorlo + melatonina 1 mM;
- EXT M 10: extender sine tuorlo + melatonina 10 mM.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità regolata su 0,380-0,385 OSM/kg.

3.3.3 3° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL TREALOSIO E DELLA MELATONINA ADDIZIONATI ALL'EXTENDER BASE

Sulla base dei dati ottenuti nelle due prove precedenti è stata effettuata una prova di congelamento addizionando all'extender base le concentrazioni di trealosio e melatonina risultate migliori. Una soluzione di trealosio (320 mM) in acqua milliQ (come descritto nel primo esperimento) e una di melatonina diluita in DMSO (come descritto nel secondo esperimento) sono state addizionate all'extender base, al fine di ottenere i seguenti gruppi:

- EXT: extender base (controllo);
- T 50%: extender trealosio 50% (0,187 mM);
- T 75%: extender trealosio 75% (0,281 mM);
- T 50% M 0,1: extender trealosio 50% (0,187 mM) + melatonina 0,1 mM;
- T 75% M 0,1: extender trealosio 75% (0,281 mM) + melatonina 0,1 mM.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità regolata su 0,380-0,385 OSM/kg.

3.3.4 4° ESPERIMENTO: UTILIZZO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI LECITINA 1%-6%

Partendo dalle notizie presenti in letteratura circa l'utilizzo della lecitina di soia in sostituzione del tuorlo d'uovo nell'extender di congelamento per il seme di ariete (Forouzanfar *et al.*, 2010), è stata effettuata una prova di congelamento addizionando all'extender base diverse concentrazioni di lecitina di soia (Sigma Aldrich), per valutare quale fosse la migliore per il becco. I gruppi sono stati i seguenti:

- EXT: extender base (controllo);
- L 1: lecitina 1% - extender base (w/v);
- L 2: lecitina 2% - extender base (w/v);
- L 3: lecitina 3% - extender base (w/v);
- L 4: lecitina 4% - extender base (w/v);
- L 5: lecitina 5% - extender base (w/v);
- L 6: lecitina 6% - extender base (w/v).

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e le osmolarità erano rispettivamente: L 1: 0,382 OSM/kg; L 2: 0,389 OSM/kg; L 3: 0,402 OSM/kg; L 4: 0,438 OSM/kg; L 5: 0,442 OSM/kg; L 6: 0,460 OSM/kg.

3.3.5 5° ESPERIMENTO: UTILIZZO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI LECITINA 1% - 20%

Sulla base dei dati ottenuti nella prova lecitina 1% - 6% è stata effettuata una prova di congelamento addizionando all'extender base la lecitina di soia con un range più ampio di concentrazioni (Sigma Aldrich), per valutare quale fosse la migliore. I gruppi sono stati i seguenti:

- EXT: extender base (controllo);
- L 1: lecitina 1% - extender base (w/v);
- L 5: lecitina 5% - extender base (w/v);
- L 10: lecitina 10% - extender base (w/v);
- L 15: lecitina 15% - extender base (w/v);
- L 20: lecitina 20% - extender base (w/v).

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e le osmolarità erano rispettivamente: L 1: 0,382 OSM/kg; L 5: 0,442 OSM/kg; L 10: 0,465 OSM/kg; L 15: 0,499 OSM/kg; L 20: 0,506 OSM/kg.

3.3.6 6° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA LECITINA CON LA MELATONINA

Dopo aver individuato le due concentrazioni di lecitina e melatonina che hanno dato risultati migliori, è stato deciso di eseguire una prova di congelamento addizionando una soluzione di melatonina (preparata come descritto nel secondo esperimento) all'extender base con lecitina 1% (w/v), con una concentrazione finale di melatonina di 0,1 mM e valutare quindi l'eventuale azione combinata delle due componenti, con i seguenti gruppi:

- EXT: extender base (controllo);
- L1 M 0,1: extender lecitina 1% (w/v) + melatonina 0,1 mM;
- EXT M 0,1: extender base + melatonina 0,1 mM.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità regolata su 0,380-0,385 OSM/kg.

3.3.7 7° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLE DIVERSE CONCENTRAZIONI DI COLESTEROLO

Sulla base delle notizie esistenti circa i benefici effetti del colesterolo nella stabilizzazione della membrana spermatica durante il congelamento, è stato deciso di effettuare una prova mettendo a confronto diverse concentrazioni di colesterolo, come riportato in letteratura nel becco (Amidi *et al.*, 2010), per valutare quale fosse la migliore quando usato addizionato all'extender base, in sostituzione del tuolo d'uovo. Il colesterolo utilizzato in questo lavoro è una molecola già solubilizzata con le metil-beta-ciclodestrine (Sigma Aldrich). La soluzione è stata preparata diluendo il colesterolo in polvere in extender base per ottenere le seguenti concentrazioni: 0,75 mg/ml; 1,5 mg/ml; 2,25 mg/ml; 3 mg/ml; 3,75 mg/ml; 4,5 mg/ml; 5,25 mg/ml. I gruppi sono stati:

- EXT: extender base (controllo);
- C 0,75: 0,75 mg/ml colesterolo in extender base;
- C 1,5: 1,5 mg/ml colesterolo in extender base;
- C 2,25: 2,25 mg/ml colesterolo in extender base;
- C 3: 3 mg/ml colesterolo in extender base;
- C 3,75: 3,75 mg/ml colesterolo in extender base;
- C 4,5: 4,5 mg/ml colesterolo in extender base;
- C 5,25: 5,25 mg/ml colesterolo in extender base.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità compresa fra 0,380 e 0,383 OSM/kg.

3.3.8 8° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL COLESTEROLO CON LA MELATONINA

Dopo aver individuato le due concentrazioni di colesterolo e melatonina che hanno dato i risultati migliori, è stato deciso di eseguire una prova di congelamento addizionando una soluzione di melatonina (preparata come descritto nel secondo esperimento) all'extender base con colesterolo 4,5 mg/ml, con una concentrazione finale di melatonina di 0,1 mM e valutare quindi l'eventuale azione combinata delle due componenti, con i seguenti gruppi:

-EXT: extender base;

-C 4,5: extender colesterolo 4,5 mg/ml;

-C 4,5 M 0,1: extender colesterolo 4,5 mg/ml + melatonina 0,1 mM.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità compresa fra 0,380 e 0,383 OSM/kg.

3.3.9 9° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA LECITINA COL TREALOSIO IN CONGELAMENTO

In riferimento alle notizie presenti in letteratura sull'ariete (Najafi *et al.*, 2013), in questa prova si è voluta valutare l'efficacia del trealosio addizionato alla parte glicerolata dell'extender base e dell'extender lecitina 1% a 4°C (cioè alla quinta parte di medium che si aggiunge una volta che il seme ha effettuato la prima fase di discesa termica; vedi protocollo di congelamento del seme). Una volta raggiunta la temperatura di 4°C è stata addizionata la frazione glicerolata dell'extender contenente trealosio per raggiungere le concentrazioni finali di 50 mM e 100 mM, calcolate sul volume totale. La prova è stata effettuata con i seguenti gruppi:

- EXT: extender base (controllo);
- L1: extender lecitina 1%;
- L1 T 50: extender lecitina 1% + trealosio 50 mM;
- L1 T100: extender lecitina 1% + trealosio 100 mM;
- EXT T50: extender base + trealosio 50 mM;
- EXT T100: extender base + trealosio 100 mM.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e le osmolarità erano rispettivamente: L 1: 0,382 OSM/kg; L1 T 50: 0,454 OSM/kg; L 1 T 100: 0,491 OSM/kg; EXT T 50: 0,425 OSM/kg; L 1 T 100: 0,491 OSM/kg.

3.3.10 10° ESPERIMENTO: UTILIZZO DEL COLESTEROLO COL TREALOSIO IN CONGELAMENTO

In questa prova si è voluta valutare l'efficacia del trealosio addizionato alla parte glicerolata dell'extender base e dell'extender colesterolo 4,5 mg/ml a 4°C (cioè alla quinta parte di medium che si aggiunge una volta che il seme ha effettuato la prima fase di discesa termica; vedi protocollo di congelamento del seme). Una volta raggiunta la temperatura di 4°C è stata addizionata la frazione glicerolata dell'extender contenente trealosio per raggiungere le concentrazioni finali di 50 mM e 100 mM, calcolate sul volume totale. La prova di congelamento è stata effettuata con i seguenti gruppi:

- EXT: extender base;
- C 4,5: extender colesterolo 4,5 mg/ml;
- C 4,5 T 50: extender colesterolo 4,5 mg/ml + trealosio 50 mM;
- C 4,5 T 100: extender colesterolo 4,5 mg/ml + trealosio 100 mM;

- EXT T 50: extender trealosio 50 mM;
- EXT T 100: extender trealosio 100 mM.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità compresa fra 0,380 e 0,383 OSM/kg.

3.3.11 11° ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLE MIGLIORI CONCENTRAZIONI DI LECITINA E COLESTEROLO DA SOLI E ASSOCIATI AL TREALOSIO, CONFRONTATE CON L'EXTENDER TUORLO E UN EXTENDER COMMERCIALE.

Sulla base dei dati ottenuti è stata effettuata l'ultima prova di congelamento mettendo a confronto fra loro le concentrazioni di colesterolo (4,5 mg/ml) e lecitina (1%) risultate migliori con l'extender base al 20% di tuorlo d'uovo e un extender commerciale (OVIXcell- inv technologies). Inoltre in questa prova agli extenders lecitina 1% e colesterolo 4,5 mg/ml è stato addizionato il trealosio in fase di congelamento, cioè una volta raggiunta la temperatura di 4°C, insieme alla frazione glicerolata dell'extender (come nei due esperimenti precedenti), per ottenere le concentrazioni finali di 50 mM e 100 mM, calcolate sul volume totale. I gruppi sono stati i seguenti:

- EXT: extender base (controllo);
- L 1: extender lecitina 1%;
- L1 T 50: extender lecitina 1%, + trealosio 50 mM;
- L1 T 100: extender lecitina 1%, + trealosio 100 mM;
- C 4,5: extender colesterolo 4,5 mg/ml;
- C 4,5 T 50: extender colesterolo 4,5 mg/ml + trealosio 50 mM;

-C 4,5 T 100: extender colesterolo 4,5 mg/ml + trealosio 100 mM;

-EXT T: extender tuorlo d'uovo 20%;

-EXT C: extender commerciale.

Il pH di queste soluzioni è stato portato a 7.2 e l'osmolarità erano rispettivamente: EXT 0,380 OSM/kg; L 1: 0,382 OSM/kg; C 4,5: 0,383; EXT T 0,3

3.4 VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ SPERMATICA DOPO SCONGELAMENTO

Il seme congelato è stato scongelato e sottoposto ad alcune valutazioni. Lo scongelamento dei pellets è stato effettuato in provette in vetro immerse in un bagno termostato a 39°C in continua agitazione per circa 20 secondi (Berlinguer *et al.*, 2007). Successivamente 3 µl di seme sono stati diluiti con 200 µl di SOF di coltura, Synthetic Oviductal Fluid (SOF; Tervit *et al.*, 1972) e questa diluizione è stata utilizzata per le valutazioni successive.

Le stesse analisi effettuate al momento del prelievo sono state quindi ripetute, in modo da poter comparare i dati ottenuti sul seme fresco con i diversi valori di vitalità, motilità e ATP riscontrate sul seme congelato in seguito all'utilizzo dei diversi extenders. Sono stati quindi presi in considerazione i parametri di vitalità, tramite striscio e colorazione con cosina-nigrosina, la motilità totale e progressiva, la percentuale di spermatozoi rapidi tramite metodica CASA e l'estrazione e il dosaggio dell'ATP intracellulare tramite metodo enzimatico. Inoltre sul seme scongelato sono stati anche valutati il grado di frammentazione del DNA tramite metodica "Comet assay neutrale", la capacità antiossidante totale, il dosaggio dei Tioli totali e del GSH mediante spettrofotometria e la capacità fecondante mediante prova di fecondazione eterologa. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi statistica.

3.4.1 Frammentazione del DNA (Comet assay)

La Comet assay (Single Cell Gel Electrophoresis) è una tecnica semplice e sensibile per la rilevazione del danno al DNA a livello delle singole cellule eucariote. I danni rilevabili possono essere rotture del singolo filamento di DNA o del doppio filamento, e in entrambi i casi, a seconda delle condizioni sperimentali, possono formarsi frammenti.

La tecnica comporta l'incorporazione di cellule in una sospensione di agarosio a basso punto di fusione, la loro lisi e successiva elettroforesi a pH neutro. Il tutto è seguito da un'analisi visiva con la colorazione del DNA e dal calcolo della fluorescenza per determinare l'entità del danno al DNA.

Il test si chiama Comet assay perché, in seguito alla corsa elettroforetica, tanto maggiore è il danno al DNA della cellula, tanto più i frammenti del DNA si allontaneranno dal nucleo cellulare facendole assumere, dopo colorazione, l'aspetto di una cometa.

La frammentazione del DNA è stata valutata con il "comet assay neutrale", eseguito in accordo al metodo descritto da Sakkas *et al.* (2002), con alcune modifiche.

Inizialmente 20 μ L di ciascun campione sono stati lavati in 1 ml di BSA allo 0,1% in PBS. E' stata effettuata una prima centrifugata a 500 g per 10 minuti ed, eliminato il surnatante, è stato eseguito un secondo lavaggio risospesendo il pellet di cellule in 1 ml di BSA allo 0,1% in PBS e ricentrifugato a 1700 x g per 7 minuti. I pellets così ottenuti sono stati quindi sottoposti ad una doppia diluizione. Per la prima sono stati aggiunti al pellet 200 μ L di agarosio low-melting point (Invitrogen 3076245) allo 0,8% a 37°C; 5 μ L di questa soluzione sono stati addizionati ad altri 300 μ L dello stesso agarosio fuso e infine 11 μ L della seconda diluizione sono stati seminati con una micropipetta graduata su vetrini precedentemente ricoperti di agarosio normal-melting point (1.5% in PBS), montati con il coprioggetto 20X20 e lasciati per 15 minuti a 4°C a solidificare. Dopo questa prima fase è stato rimosso il coprioggetto e altri 15 μ L di agarosio low-melting point allo 0.8% sono stati depositati sugli

strati precedenti per formarne un terzo. Una volta rimontato il coprioggetto i vetrini sono stati messi a solidificare per 15 minuti a 4°C. Terminata la seconda fase a 4°C i coprioggetto sono stati rimossi e i vetrini immersi in una soluzione ghiacciata di lisi preparata secondo la seguente ricetta: NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM (pH 10), 10 mM dithiothreitol [DTT], 250 µL di TRITON (Sigma 114H0521) (0,5mL/50mL) e lasciati per 1 h a 4°C.

Successivamente sono stati aggiunti 50 µL di una proteinasi K (10 mg/ml) che è stata lasciata ad incubare per 1 h a 37°C. Dopo questa fase, i vetrini sono stati sciacquati in PBS e adagiati in un contenitore orizzontale per elettroforesi riempito di un buffer neutrale preparato al momento (soluzione TAE: Tris-acetate-EDTA, pH 7.3) . L'elettroforesi è stata eseguita a 10 V e a 6 mA per 20 minuti. Dopo la corsa elettroforetica, i vetrini sono stati sottoposti a tre passaggi di lavaggio neutralizzante in un buffer Tris-HCl 0,4 M (pH 7.5) per 10, 5 e 5 minuti e quindi fissati in metanolo in due passaggi da tre minuti ciascuno. I campioni sono stati infine colorati con propidium iodide (PI) (1mg/mL) in PBS, montati con un coprioggetto e analizzati con un microscopio a fluorescenza.

Le immagini delle comet digitali vengono catturate con un microscopio Olympus equipaggiato con una fotocamera CCD e supportato con un software di immagine Olympus CellF. Vengono misurate 50 comet per campione usando un software di analisi di immagine (Comet Score Professional software 1.0.1.36 TriTekCorporation). I parametri evidenziati includono la percentuale di DNA nella coda (%DNA in Tail), la percentuale di DNA nella testa e l'area della comet. La percentuale di DNA nella coda è il parametro che maggiormente esprime i risultati del metodo della comet (Collins, 2004). L'area della comet è definita come il numero di pixel presenti nell'area totale della comet. .

3.4.2 *Determinazione della capacità antiossidante totale*

La capacità antiossidante totale è stata determinata nell'estratto cellulare. Per la determinazione nell'estratto cellulare sul seme scongelato 500 µL di campione sono stati centrifugati a 7500 g e, dopo eliminazione del surnatante, addizionati ad un uguale volume di PBS con Triton 0,1% (500 µL), vortexati e lasciati 5 minuti in ghiaccio. In seguito sono stati centrifugati a 7500 g e il surnatante è stato stoccato nel freezer -80°C fino al momento del dosaggio.

La capacità antiossidante totale nel plasma seminale e nell'estratto cellulare è stata determinata usando il metodo descritto da Re e altri, con delle modifiche secondo Lewinska e altri. In breve, una soluzione di ABTS^{•+} - azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) e 3,3 mg di potassio persolfato (Dipotassium peroxodisulphate) in 7 ml di tampone fosfato 0,1M; pH 7.4. Questa soluzione è stata conservata al buio per 12 ore e poco prima del dosaggio diluita (approssimativamente 1:80) in tampone fosfato 0,1 M; pH 7.4, sino ad ottenere un'assorbanza di circa 1,0 alla lunghezza d'onda di 734 nm. Il campione è stato diluito 1:550 in tampone fosfato 0,1M; pH 7.4 e l'assorbanza è stata misurata in doppio in uno spettrofotometro Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer alla lunghezza d'onda di 734 nm, 5 minuti dopo aver aggiunto il campione alla soluzione di ABTS^{•+}. Il decremento dell'assorbanza dell'ABTS^{•+} in presenza del campione è proporzionale alla capacità antiossidante del campione stesso ed è stata espressa come capacità antiossidante Trolox equivalente (Trolox Equivalent Anti-Oxidant Capacity (TEAC)) e cioè concentrazione di Trolox che produce lo stesso effetto antiossidante del campione studiato. Il calcolo è stato eseguito sulla base di una curva standard di soluzione di Trolox da 5-20 µM in un volume di reazione totale di 550 µL.

3.4.3 Dosaggio dei tioli totali e del glutatione

I tioli sono stati determinati secondo il metodo descritto da Elman (1959). I campioni sono stati miscelati con buffer fosfato (0,3 M, pH 7.2) e con acido 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB). Dopo 10 minuti la densità ottica del complesso di colore giallo, formato dalla reazione tra i gruppi tiolici e il DTNB, è stata misurata a 400 nm con uno spettrofotometro Thermo Elecrom Corporation Genesys 10 UV Spectrophotometer. La concentrazione dei tioli viene espressa come nmoli di tioli/n° di spermatozoi ed è stata calcolata applicando la legge di Lambert e Beer, utilizzando il coefficiente di estinzione molare pari a $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Per il dosaggio dei tioli senza GSH è stata usata una miscela di reazione contenente oltre al tampone fosfato e il campione, anche EDTA 12 mM, tert-butilOH 50 mM e la Glutatione perossidasi in modo tale da ossidare tutto l'eventuale GSH presente secondo la reazione sotto schematizzata:



Per differenza di concentrazione dei tioli senza GSH dai tioli totali, si ottiene la concentrazione del GSH sempre espressa come nmoli di GSH/n° di spermatozoi .

3.4.4 Fertilizzazione eterologa

Le ovaie di ovini prepuberi, regolarmente macellati, sono state raccolte in mattatoio e trasportate entro un'ora immerse in PBS, una soluzione salina tamponata (PBS, Sigma) addizionata ad antibiotici (penicillina e streptomina 5 mg/100ml), alla temperatura di 37°C. Dopo due lavaggi in PBS le ovaie sono state dissezionate in piastre Petri usando lame di bisturi e il contenuto dei follicoli è stato raccolto nel medium di dissezione TCM 199,

supplementato con HEPES 25 mM per stabilizzare il pH, penicillina, streptomina e 0,1% (w/v) di alcool polivinilico (PVA) come macromolecola inerte (Berlinguer *et al.*, 2009). Tutte queste operazioni sono state eseguite a temperatura ambiente sotto una cappa a flusso laminare.

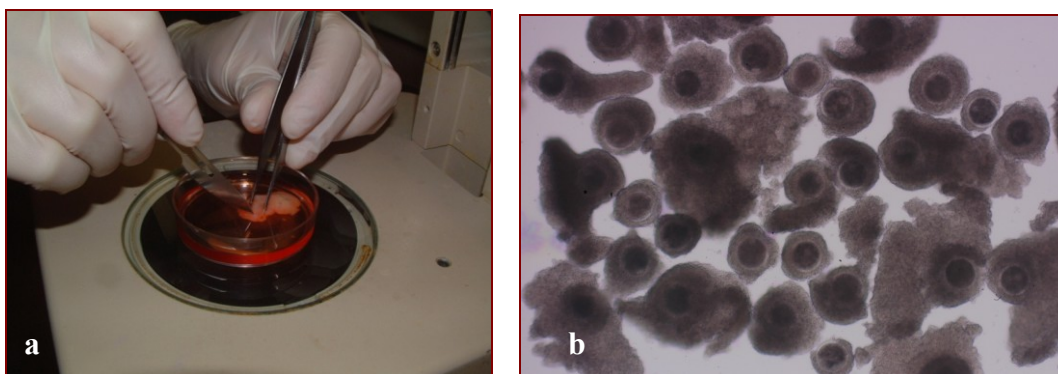


Immagine 6 Slicing” o dissezione delle ovaie per liberare gli oociti (a). Oociti selezionati con cumulo compatto (b).

Gli oociti sono stati selezionati in base ad alcuni parametri morfologici e strutturali quali: il numero di strati del complesso cumulo-oocita compreso fra 4 e 10 strati di cellule della granulosa, l'omogenea distribuzione dei lipidi nel citoplasma e il diametro cellulare intorno ai 90 μm .

Gli oociti così selezionati, dopo tre passaggi di lavaggio in medium di dissezione, sono stati messi a maturare in vitro nel medium di maturazione TCM 199 supplementato col 10% di siero di pecora in estro (OSS), antibiotici, FSH e hCG 0,1 UI/ml, cisteamina 100 μM e piruvato 8 mg/ml. Le condizioni colturali per la maturazione in vitro degli oociti sono quelle impiegate nella gran parte dei laboratori che si occupano di biotecnologie riproduttive in vitro.

Gli oociti totali sono stati suddivisi in gruppi di 25-40, adagiati in pozzetti four-well Nunc, ciascuno contenente 600 μL di medium di maturazione, ricoperti con 300 μL di olio minerale e incubati in coltura per 24 ore a 39°C in un ambiente al 5% di CO_2 in aria atmosferica.

Dopo maturazione i complessi cumulo-oociti sono stati parzialmente denudati dalle cellule della granulosa, divisi a random nei diversi gruppi sperimentali e fertilizzati in vitro. Il medium di fertilizzazione era composto da Synthetic Oviductal Fluid (SOF) supplementato con il 10% di siero di pecora in estro (v/v), 50 µg/ml di streptomicina e 50 IU/ml di penicillina (Tervit *et al.*, 1972), eparina 10 mg/ml ed ipotaurina 1 mg/ml (IVF-SOF).

Innanzitutto si è proceduto alla preparazione del seme per la fertilizzazione. Il gradiente di Percoll per la selezione degli spermatozoi è stato preparato come segue: la soluzione di Percoll 100% è stata diluita con soluzione salina 10x (NaCl 2,889 g; KCl 0,238 g; KH₂PO₄ 0,116 g; CaCl 0,112 g, Hepes 0,163 g e 50 ml di acqua milliQ) per formare il Percoll 90%. La soluzione di Percoll 45% è stata poi preparata a partire dalla precedente ma con aggiunta di un uguale volume di sperm-SOF (SOF supplementato con albumina sierica bovina 3% e Hepes 25 mM). Il gradiente è stato ottenuto pipettando 1 ml di Percoll 90% in una falcon da 15 ml e poi sovrapponendo 1 ml di Percoll 45%.

Il volume totale di 500 µL di seme proveniente da 2 pellets, dopo scongelamento in bagnetto a 37°C, è stato adagiato sullo strato di Percoll 45% e centrifugato a 1000 g a temperatura ambiente per 15 minuti. Dopo la rimozione del surnatante il pellet ottenuto è stato adagiato sul fondo di una provetta di vetro di contenente 1 ml di IVF-SOF e incubato a 39°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ per 15 minuti. Gli spermatozoi mobili ottenuti dopo lo swim up sono stati diluiti in IVF-SOF al fine di ottenere una concentrazione finale di 1x10⁶ spermatozoi/ml e incubati per 45 minuti a 39° C, in condizioni di massima umidità, al 5% di CO₂, 5% di O₂ e 90% di N₂. Terminata la preparazione del seme è stata effettuata la prova di fertilizzazione in vitro co-incubandogli spermatozoi con una media di 30 oociti di ovino prepubere maturati in vitro per 24 h in condizioni di massima umidità a 39°C, 5% di CO₂, 5% di O₂, e 90% di N₂.

Dopo 28 h di coltura i presunti zigoti sono stati lavati in medium di dissezione e fissati in

PBS e Metanolo 40% e colorati con ioduro di propidio (1mg/ml) al fine di valutare la configurazione cromatinica.

Sono stati quindi montati su un vetrino e osservati con un microscopio a fluorescenza al fine di valutare gli oociti fecondati e rapportarli al numero di oociti totali posti a fertilizzare.

3.4.5 *Analisi statistica*

La vitalità spermatica, i parametri di motilità, la concentrazione di ATP, le analisi della comet, della capacità antiossidante totale, dei tioli totali e del GSH e i risultati della fecondazione eterologa sono stati analizzati con ANOVA unidirezionale e sono espresse in media \pm SD.

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

4. RISULTATI 1° ESPERIMENTO

UTILIZZO DEL TREALOSIO ADDIZIONATO ALL'EXTENDER BASE SENZA TUORLO

4.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	79±5.2
CASA	Motili progressivi (%)	55.8± 3.7
Parame		
tri di	Rapidi (%)	75±5.2
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	141±10.1

Tabella 1. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

4.2 Vitalità spermatica

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi.

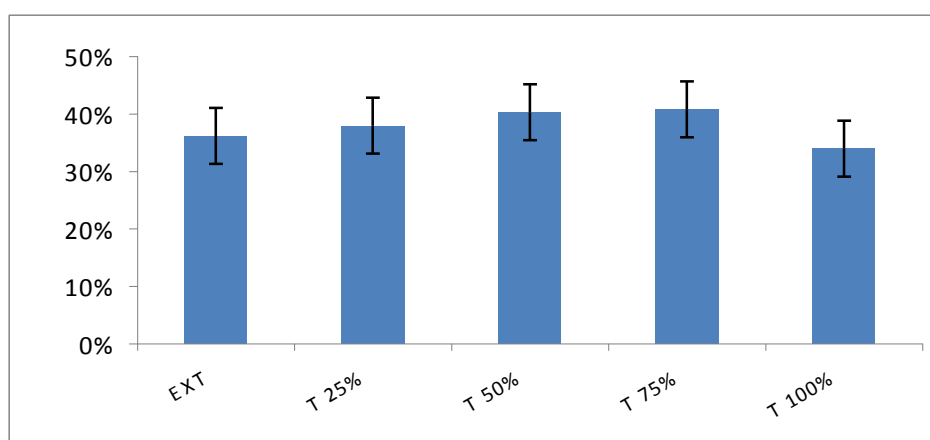


Figura 1. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito

dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non presentano differenza significativa fra loro.

4.3 Motilità progressiva e rapidi

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi.

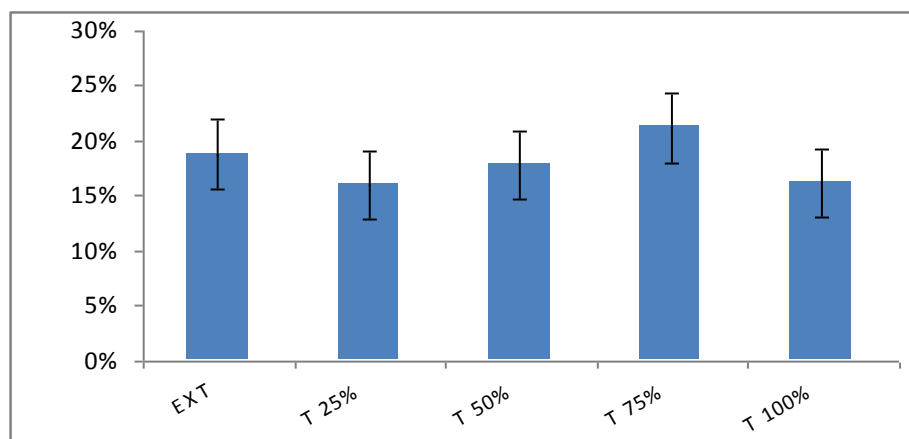


Figura 2. Motilità progressiva del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non presentano differenza statisticamente significativa fra loro.

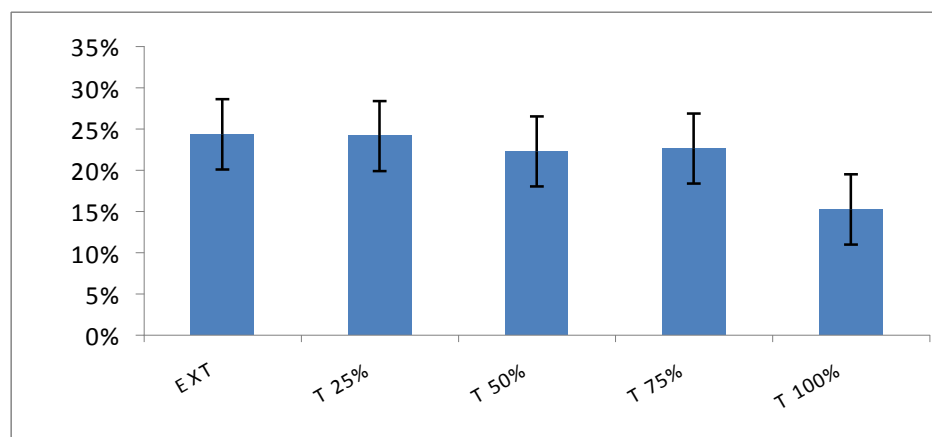


Figura 3. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non presentano differenza statisticamente significativa fra loro.

4.4 Livelli di ATP

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi.

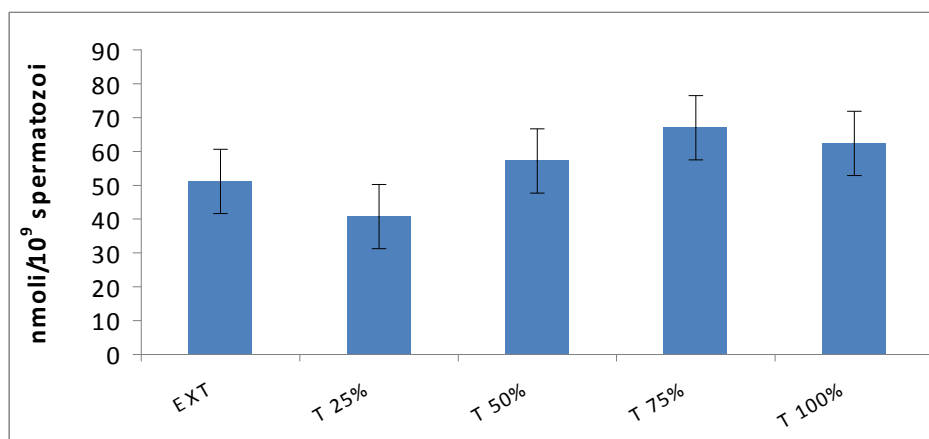


Figura 4. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. I gruppi non presentano differenza statisticamente significativa fra loro.

5. RISULTATI 2° ESPERIMENTO

ESPERIMENTO: UTILIZZO DELLA MELATONINA ADDIZIONATA ALL'EXTENDER CON TUORLO

5.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	84±6
CASA	Motili progressivi (%)	60.6± 2.4
Parametri		
di motilità	Rapidi (%)	80.3±3.2
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	125±13.3

Tabella 2. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

5.2 Vitalità spermatica

5.2.1 Primo grafico

E' stata evidenziata una differenza statisticamente significativa ($P=0,0025$) fra il gruppo EXT T M 10 ($30 \pm 4\%$), che presenta i valori più bassi e gli altri gruppi, che non differiscono fra loro.

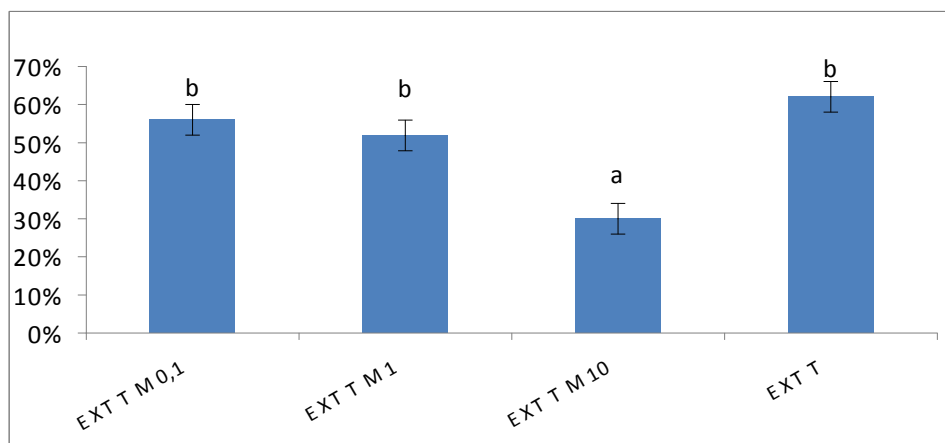


Figura 5. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo EXT T M 10 presenta differenza statisticamente significativa rispetto agli altri.

5.2.2 Secondo grafico

I gruppi con tuorlo non mostrano differenze statisticamente significative fra loro, così come i gruppi senza tuorlo. Il gruppo EXT T differisce ($P=0,0143$) dai gruppi senza tuorlo e mostra i valori più alti ($62 \pm 6\%$). La melatonina addizionata all'extender base e all'extender con tuorlo non apporta miglioramenti sulla vitalità spermatica.

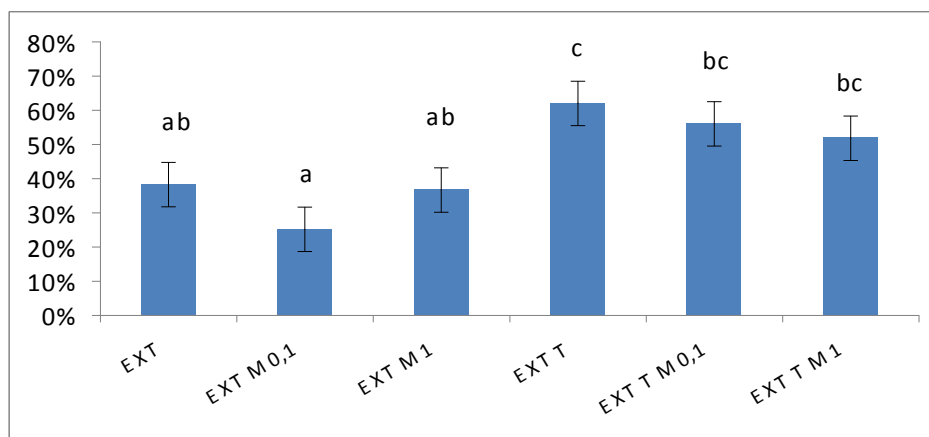


Figura 6. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. La melatonina non ha effetti benefici sul parametro analizzato.

5.3 Motilità progressiva e rapidi

5.3.1 Primo grafico

Per quanto riguarda gli spermatozoi motili progressivi e rapidi negli extenders con tuorlo il gruppo EXT T M 10 presenta differenza statisticamente significativa ($P=0$) rispetto agli altri, che non mostrano differenze fra loro e presenta i valori medi più bassi ($9 \pm 3\%$).

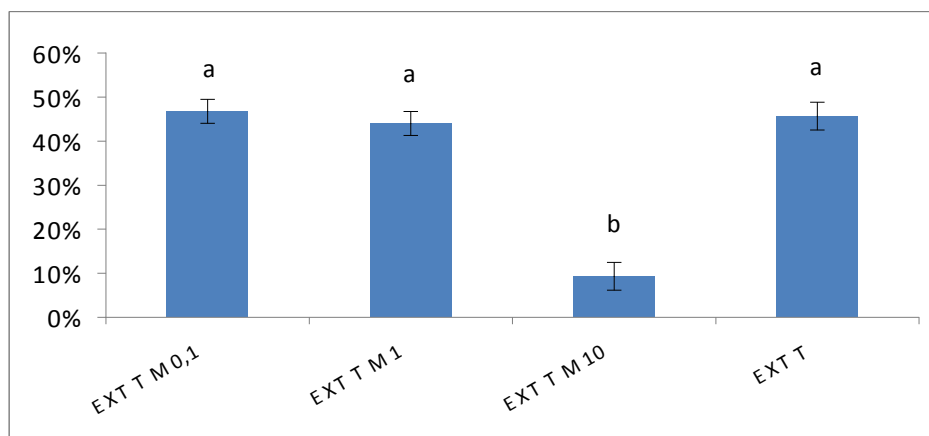


Figura 7. Motilità progressiva del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo EXT T M 10 presenta differenza statisticamente significativa rispetto agli altri.

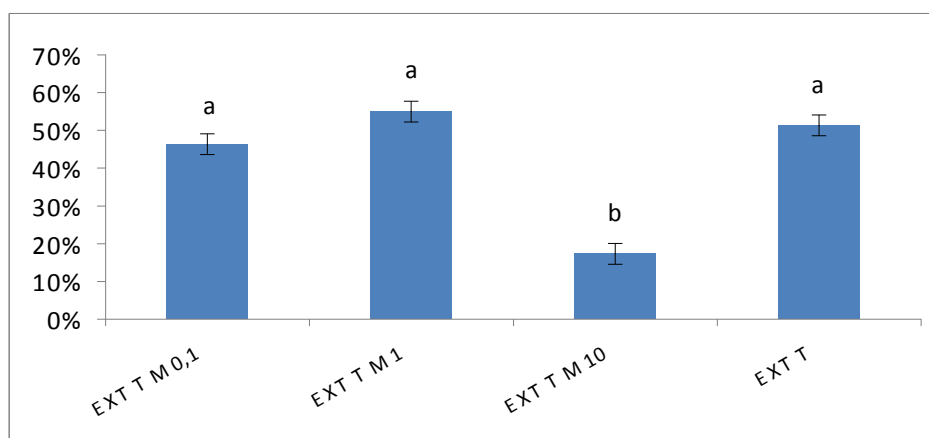


Figura 8. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo EXT T M 10 presenta differenza statisticamente significativa rispetto agli altri.

5.3.2 Secondo grafico

I gruppi con tuorlo non mostrano differenze statisticamente significative fra loro e differiscono dai gruppi senza tuorlo ($P=0$). Fra i gruppi con solo extender base e melatonina si può notare che i gruppi EXT M 0,1 e EXT M 1 non mostrano differenza, così come EXT T M 0,1 e EXT; mentre i gruppi EXT e EXT M 1 differiscono significativamente ($P=0$), con i valori migliori apportati dal gruppo EXT ($16 \pm 3\%$). L'aggiunta di melatonina non apporta benefici effetti su nessuno dei due parametri motilità progressiva e rapidi.

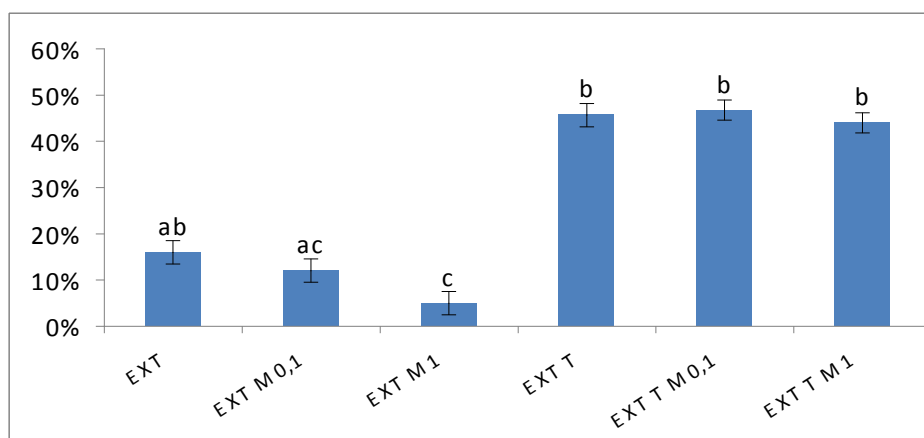


Figura 9. Motilità progressiva del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. La melatonina non apporta benefici sul parametro analizzato.

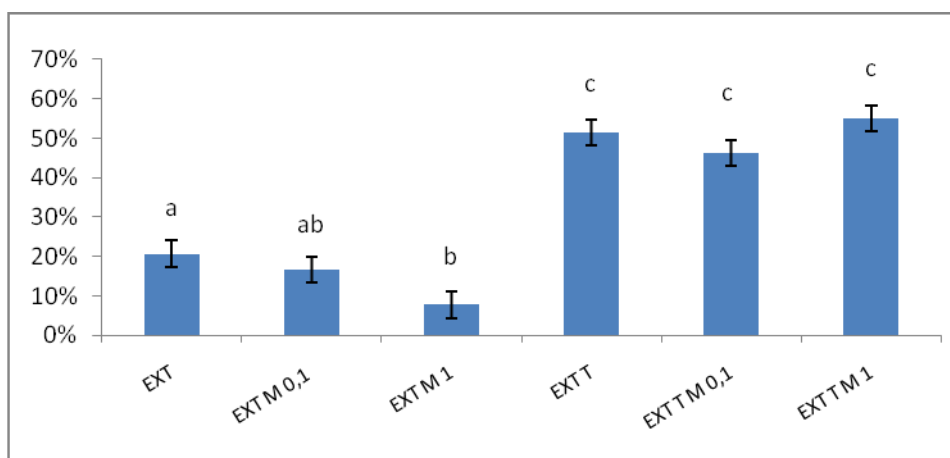


Figura 10. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. La melatonina non apporta benefici sul parametro

5.4 Livelli di ATP

5.4.1 *Primo grafico*

I due gruppi EXT T M 0,1 e EXT T M 1 non presentano differenza statisticamente significativa, così come i gruppi EXT T M 10 e il gruppo EXT T. Il gruppo EXT T M 0,1 differisce dal gruppo EXT T ($P=0,005$), che mostra i valori più alti ($80,33 \pm 9,5$ nmol ATP/ 10^9 spermatozoi). La melatonina non apporta un aumento dei livelli di ATP.

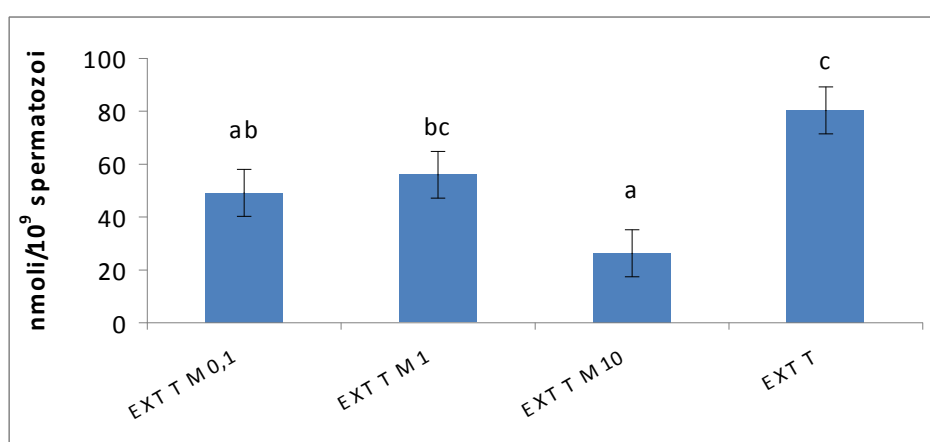


Figura 11. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. La melatonina non determina un incremento dei livelli di ATP intracellulare.

5.4.2 *Secondo grafico*

I gruppi non presentano differenze statisticamente significative fra loro, tranne il gruppo EXT T che non differisce significativamente solo rispetto ai gruppi EXT T M 1 e EXT, mentre mostra differenze rispetto agli altri ($P=0,0115$).

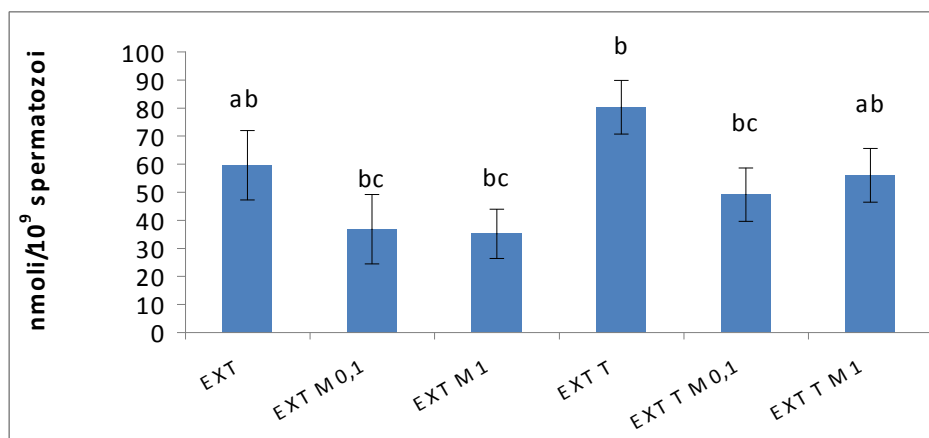


Figura 12. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. La melatonina non determina un incremento dei livelli di ATP intracellulare.

5.5 Antiossidanti

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative sui dosaggi dei tioli totali e del GSH. Per quanto riguarda la capacità antiossidante totale i gruppi che mostrano differenze ($P=0,0002$) sono il gruppo EXT M 0,1, EXT T M 1 e EXT T M 10. Fra questi il gruppo EXT T M 10 presenta i valori più alti ($8,11 \pm 0,564 \mu\text{moliTrolox}/10^9$ spermatozoi). Gli altri gruppi non presentano differenze statisticamente significative.

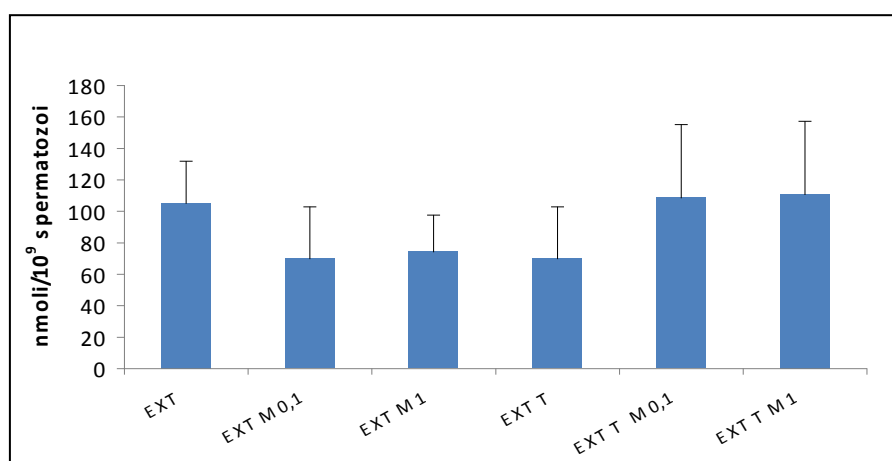


Figura 13. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non mostrano differenza significativa.

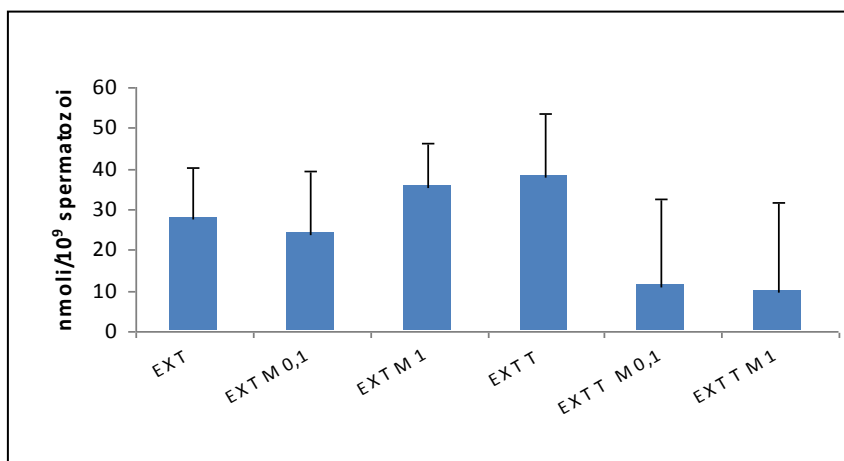


Figura 14. Glutazione nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non mostrano differenza significativa fra loro.

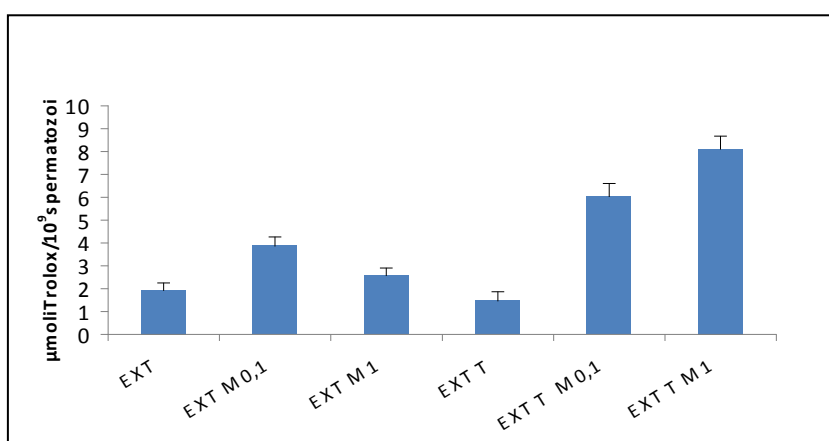


Figura 15. Capacità antiossidante totale del seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo EXT M 10 presenta i valori medi più alti.

6. RISULTATI 3° ESPERIMENTO

UTILIZZO DEL TREALOSIO E DELLA MELATONINA ADDIZIONATI ALL'EXTENDER BASE

6.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	83±3.1
CASA	Motili progressivi (%)	50.2±3.5
Parametri		
di motilità	Rapidi (%)	83±3.7
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	157±15

Tabella 3. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

6.2 Vitalità spermatica

Non è stata evidenziata differenza statisticamente significativa ($P=0,7454$) fra i gruppi. I valori medi dei vari gruppi sono vicini fra loro, anche se i più alti sono dati dal gruppo EXT ($0,50 \pm 3\%$), La melatonina e il trealosio in associazione non migliorano il parametro vitalità.

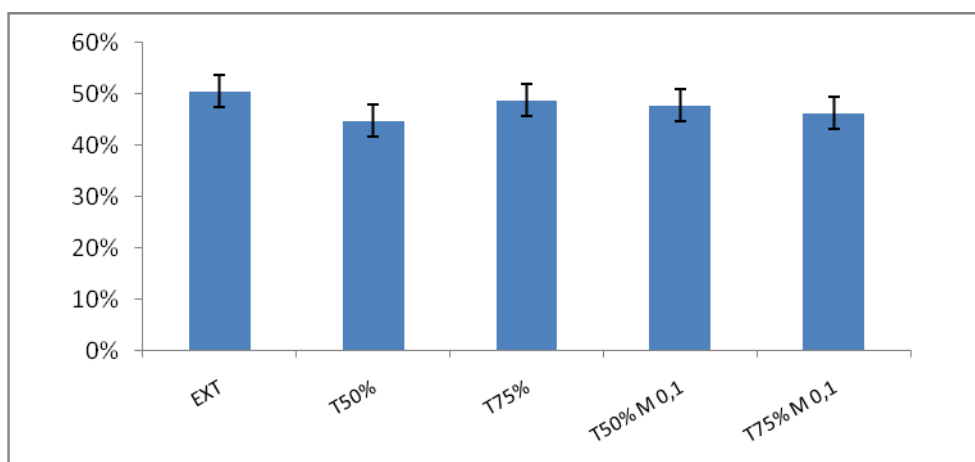


Figura 16. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non presentano differenza statisticamente significativa fra loro.

6.3 Motilità progressiva e rapidi

Sui motili progressivi non sono state evidenziate differenze statisticamente significative ($P=0,7627$) fra i vari gruppi. Il gruppo T 75% mostra i valori medi più alti ($0,23 \pm 3\%$). Anche per quanto riguarda i rapidi non sono presenti differenze, con i valori più alti riportati dal gruppo EXT T 75 ($0,26 \pm 4\%$). La melatonina e il trealosio in associazione non migliorano i parametri motilità progressiva e rapidi.

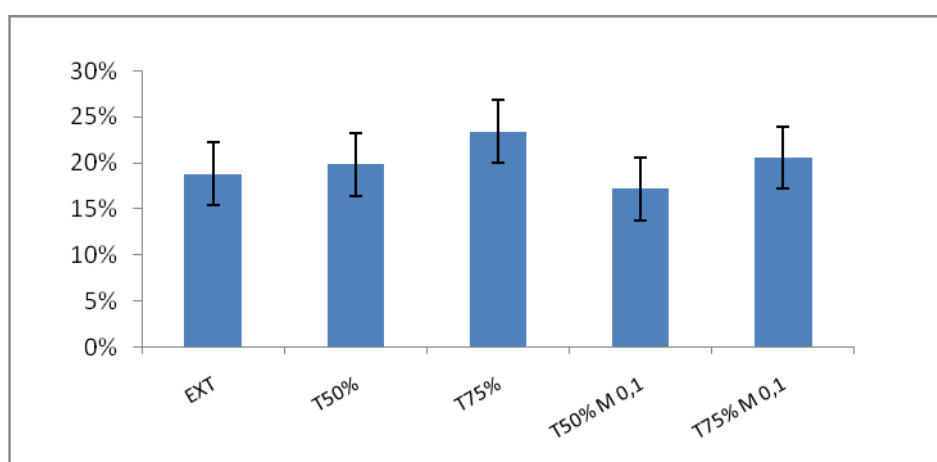


Figura 17. Motilità progressiva del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative fra i gruppi.

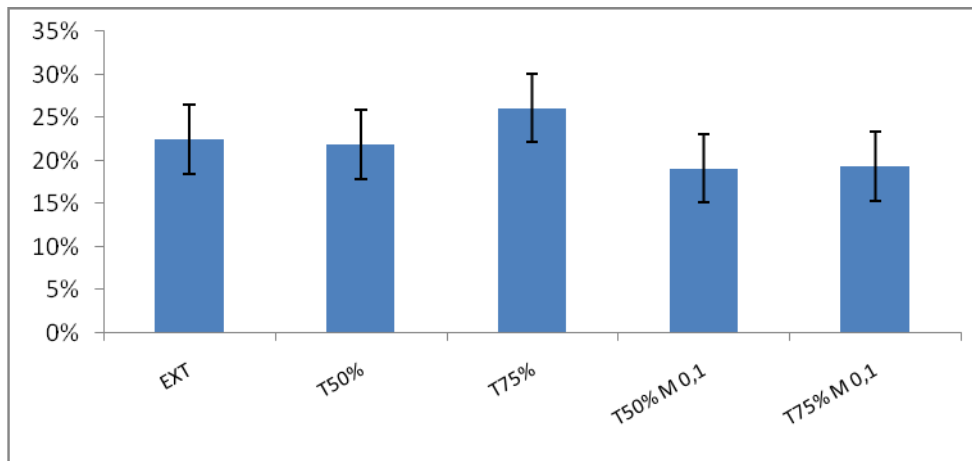


Figura 18. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative fra i gruppi.

6.4 Livelli di ATP

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative ($P=0,5414$) fra i vari gruppi.

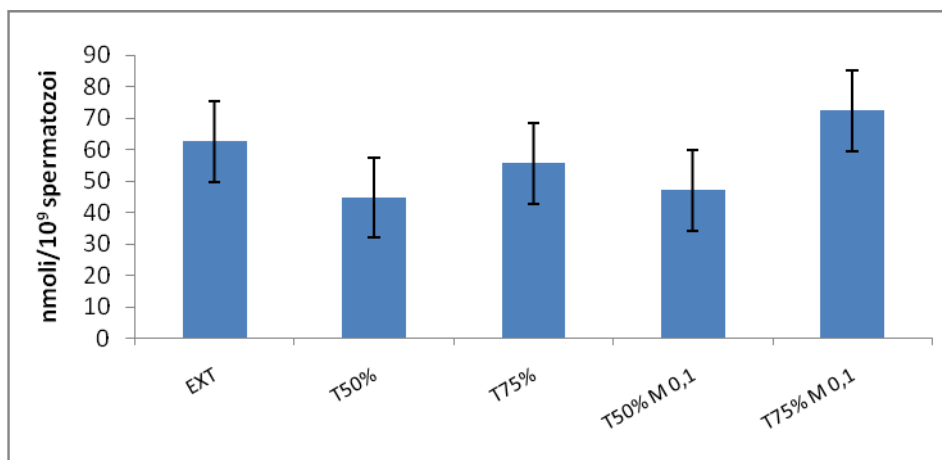


Figura 19. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. La melatonina e il trealosio in associazione non determinano un incremento dei livelli di ATP intracellulare.

7. RISULTATI 4° ESPERIMENTO

UTILIZZO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI LECITINA 1% - 6%

7.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	85.2±5.1
CASA	Motili progressivi (%)	49±3.1
Parame		
tri di	Rapidi (%)	74.2±3.8
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	122±11.8

Tabella 4. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

7.2 Vitalità spermatica

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi. Il gruppo L 1 ha dato valori medi più alti.

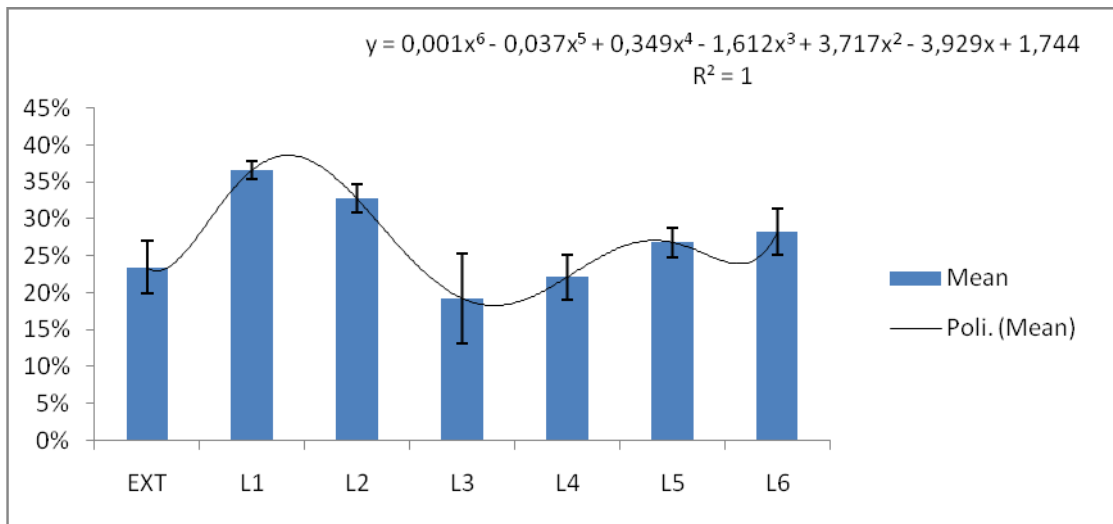


Figura 20. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non presentano differenza statisticamente significativa fra loro.

7.3 Motilità progressiva e rapidi

Sulla motilità progressiva i gruppi L 1 e L 2 non mostrano differenza statisticamente significativa fra loro e rispetto al gruppo L 5, che a sua volta non differisce significativamente dagli altri gruppi. Il gruppo L 1 ha dato valori medi più alti.

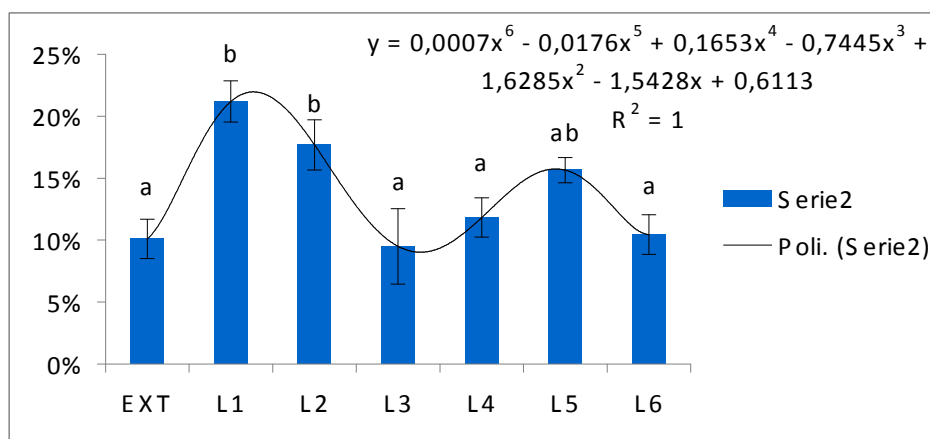


Figura 21. Motilità progressiva del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo L 1 mostra i valori più alti.

Per quanto riguarda i rapidi i gruppi non mostrano differenza statisticamente significativa fra loro, tranne i gruppi L 1 e L 2 che fra loro non differiscono significativamente, così come L 2, L 4 e L 5.

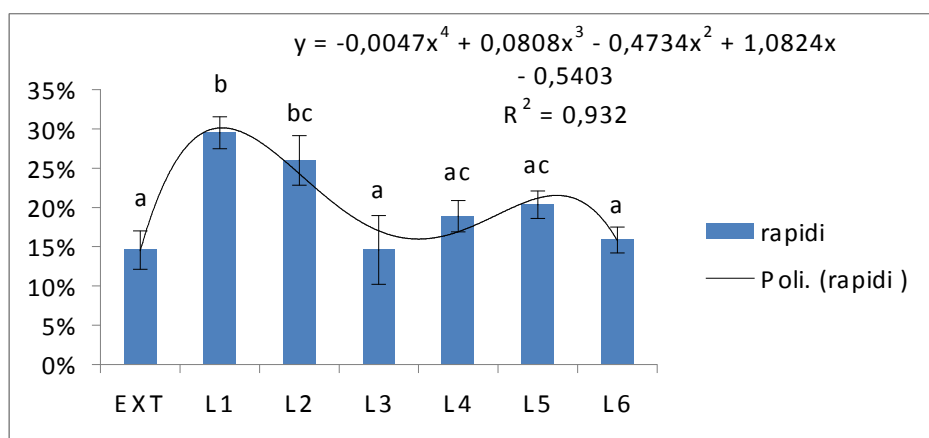


Figura 22. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo extender L 1 mostra i valori medi più alti rispetto a tutti gli altri gruppi.

7.4 Livelli di ATP

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi. Il gruppo L 1 ha dato valori medi più alti.

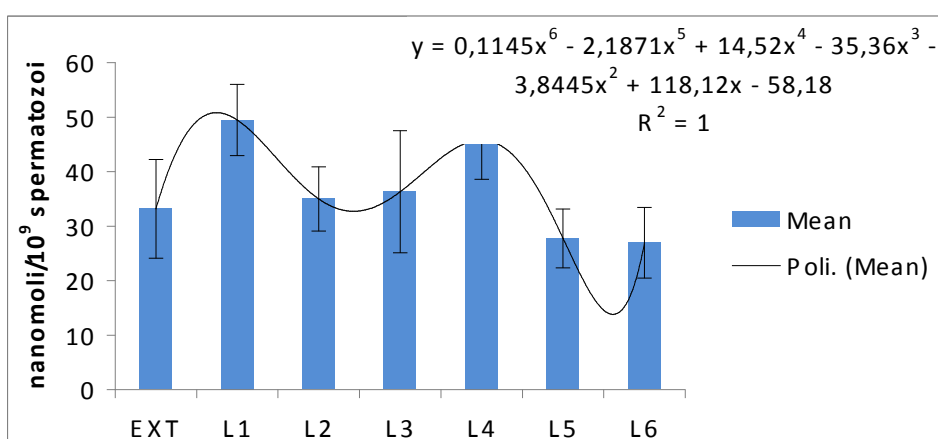


Figura 23. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco.

7.5 Antiossidanti

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi in nessuno dei dosaggi effettuati.

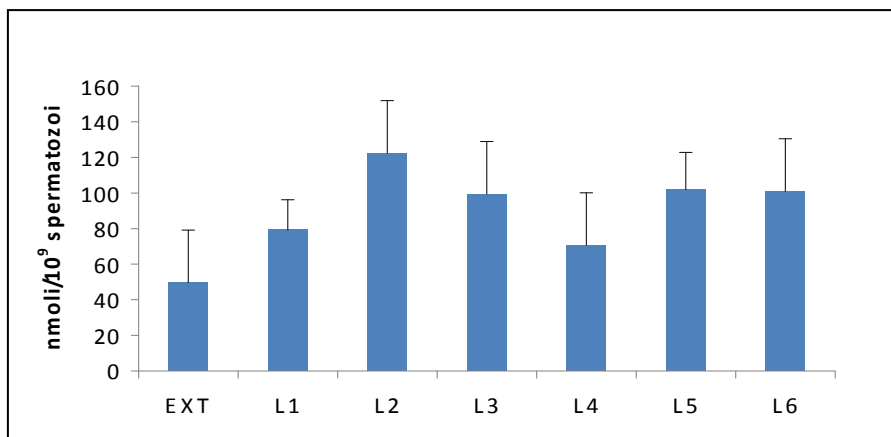


Figura 24. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

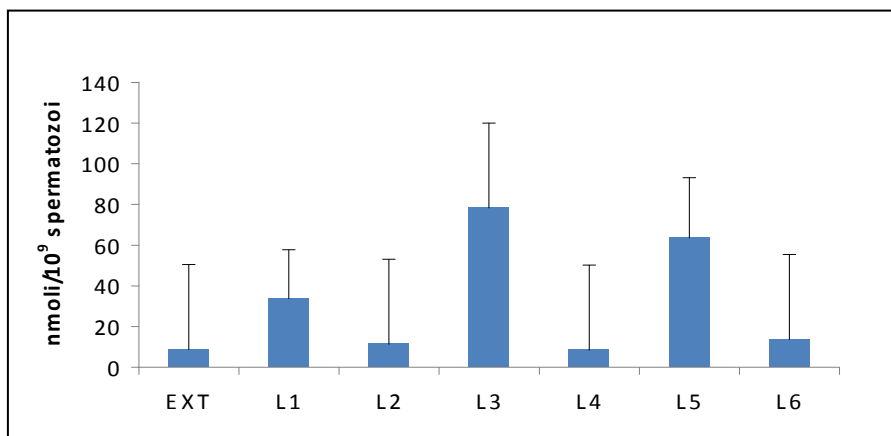


Figura 25. Glutazione nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

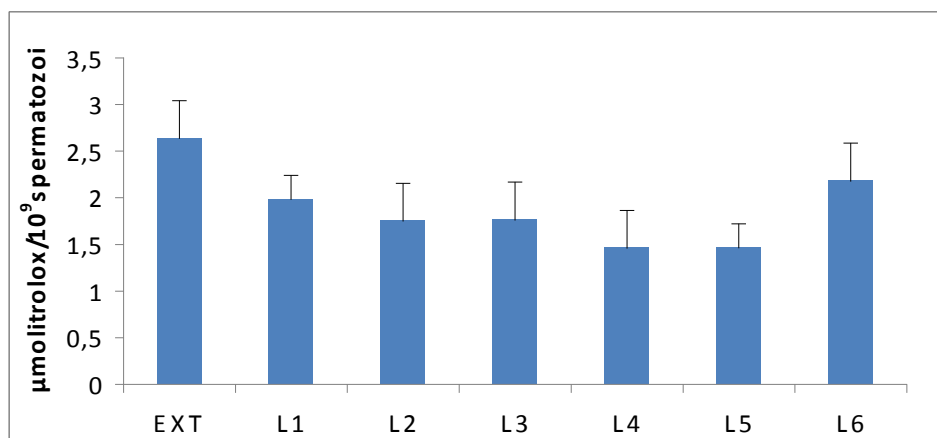


Figura 26. Capacità antiossidante totale nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

8. RISULTATI 5° ESPERIMENTO

UTILIZZO DI DIVERSE CONCENTRAZIONI DI LECITINA 1% - 5% - 10% -15% - 20%

8.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	91±5.1
CASA	Motili progressivi (%)	48±1.2
Parame		
tri di	Rapidi (%)	78.4±3.6
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	118±12.3

Tabella 5. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

8.2 Vitalità spermatica

I gruppi EXT, L 5 e L 10 non mostrano differenze statisticamente significative fra loro, così come i gruppi L 1, L 10, L 15 e L 20. I valori medi più alti sono dati dal gruppo L 1 (37 ± 1%), che differisce significativamente (P=0,013) rispetto al gruppo L 5 e al gruppo EXT.

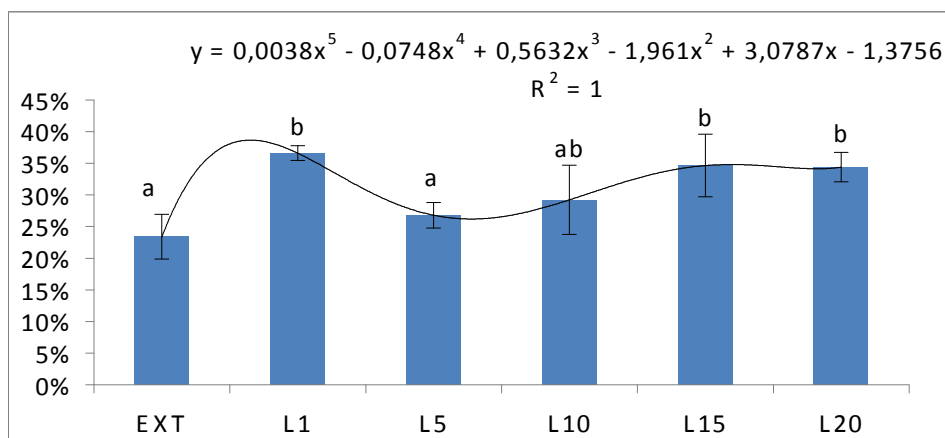


Figura 27. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I valori medi migliori sono dati dal gruppo L1.

8.3 Motilità progressiva e rapidi

Per quanto riguarda la motilità progressiva il gruppo L 1 non differisce significativamente dal gruppo L 15, il quale a sua volta non presenta differenza significativa rispetto ai gruppi L 5 e L 10. Il gruppo L 1 mostra differenza significativa ($P=0$) rispetto ai gruppi EXT, L 5, L 10 e L 20.

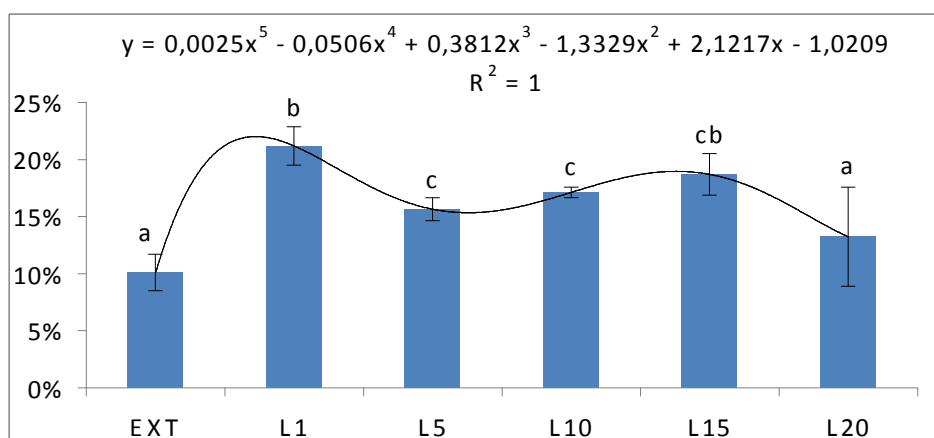


Figura 28. Motilità progressiva del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo L1 mostra i valori medi più alti fra tutti ed è significativamente migliore del del controllo (EXT).

Per quanto riguarda i rapidi il gruppo L 1 differisce in maniera statisticamente significativa dagli altri ($P=0,001$), tranne che dal gruppo L 15, ma presenta i valori medi più alti ($30 \pm 2\%$) ed è migliore del controllo (EXT).

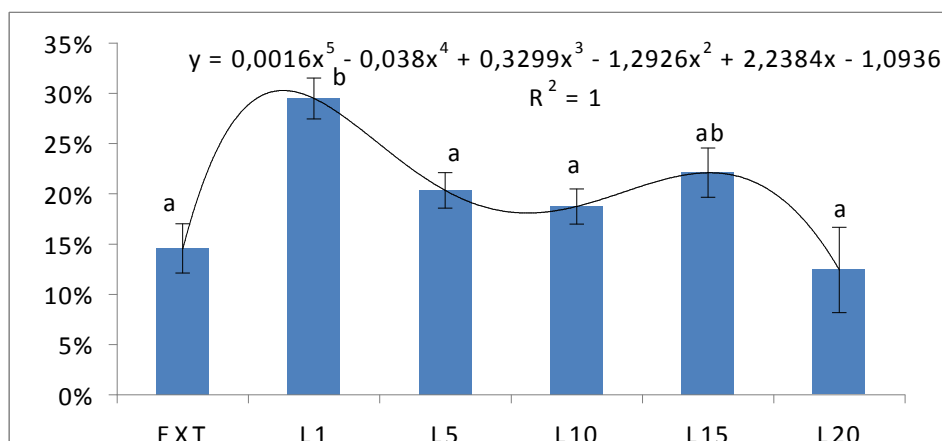


Figura 29. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. La lecitina 1% influenza positivamente il parametro rispetto all'extender.

8.4 Livelli di ATP

I gruppi EXT, L 5, L 10, L 15 e L 20 non presentano differenza statisticamente significativa fra loro, così come i gruppi L 1, L 10 e L 15. Il gruppo L 5 differisce ($P=0,036$) dai gruppi L 1. I valori medi più alti sono riportati dal gruppo L 1 ($49,46 \pm 6,53$ nmol ATP/ 10^9 spermatozoi).

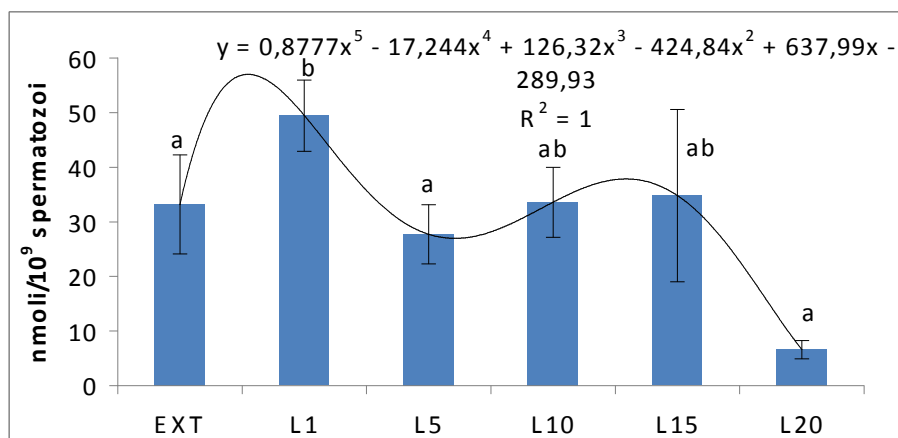


Figura 30. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco.

8.5 Antiossidanti

Per quanto riguarda il dosaggio dei tioli totali e del GSH i gruppi EXT, L 1 e L 5 presentano differenza statisticamente significativa ($P=0,0002$ per i tioli e $P=0,0001$ per il GSH) fra loro e in particolare il gruppo L 5 presenta i valori medi più alti sia di tioli totali ($139 \pm 2,175$ nmolTioliTot/ 10^9 spermatozoa) che di GSH ($116,65 \pm 2,27$ nmolGSH/ 10^9 spermatozoa). Per i gruppi L 10, L 15 e L 20 non è stato possibile effettuare il dosaggio a causa dell'alta viscosità del medium.

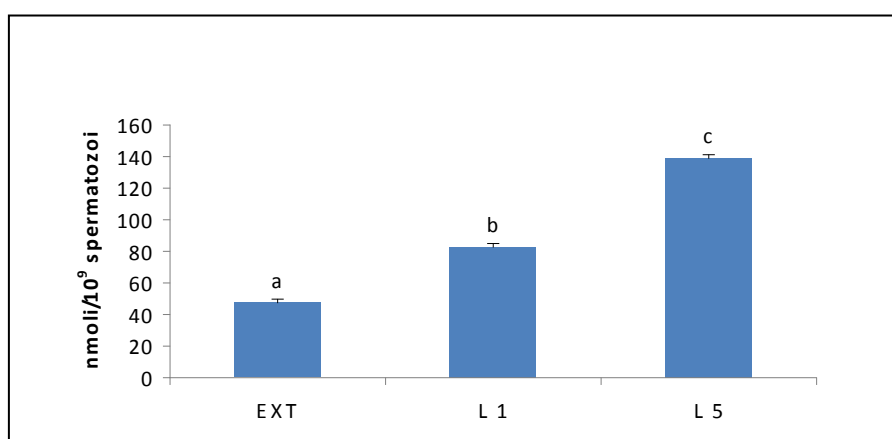


Figura 31. Livelli di tioli totali nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo L1 e L5 mostrano valori significativamente maggiori del controllo.

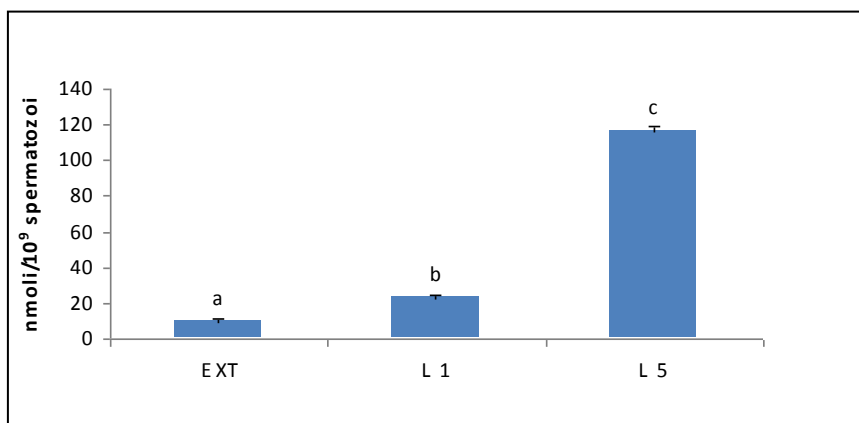


Figura 32. Livelli di glutazione nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo L1 e L5 mostrano valori significativamente maggiori del controllo

Per quanto riguarda la capacità antiossidante totale il gruppo EXT mostra differenza statisticamente significativa ($P=0,0302$) rispetto agli altri gruppi, che non differiscono significativamente fra loro. Il gruppo EXT mostra i valori più alti ($2,638 \pm 0,267$ $\mu\text{moliTrolox}/10^9$ spermatozoi). Anche in questo caso non è stato possibile dosare il gruppo L 20 a causa dell'alta viscosità del medium.

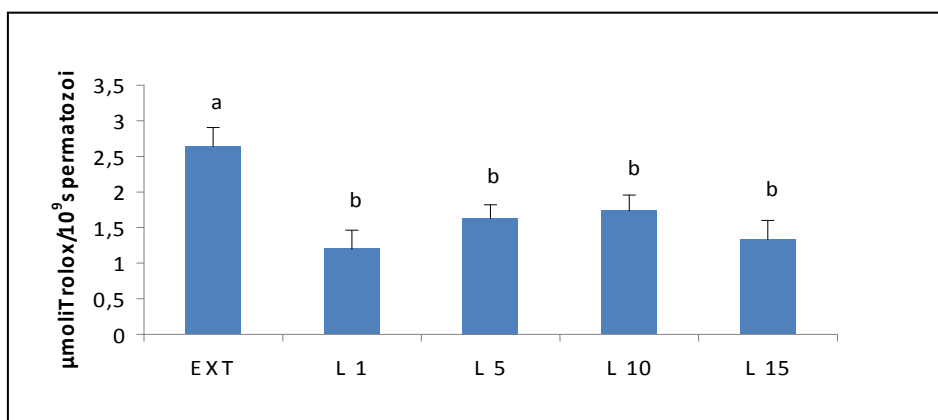


Figura 33: Capacità antiossidante totale nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo EXT mostra i valori medi più alti, per cui la lecitina sembra non influenzare questo parametro.

9. RISULTATI 6° ESPERIMENTO

UTILIZZO DELLA LECITINA CON LA MELATONINA

9.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	89.2±2.7
CASA	Motili progressivi (%)	50.4±2.2
Parame		
tri di	Rapidi (%)	81.2±2.8
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	139±13.1

Tabella 6. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

9.2 Vitalità spermatica

E' stata rilevata differenza statisticamente significativa fra i gruppi EXT; EXT M 1 e L 1 M 0,1 (P=0,003), con i valori medi migliori riportati dal gruppo L 1 M 0,1 (45 ± 2%). Il gruppo L 1 M 0,1 non mostra differenza significativa dai gruppi L 1 e EXT M 0,1. L'aggiunta di melatonina 0,1 mM all'extender lecitina non migliora questo parametro. Inoltre il gruppo EXT M 1 non differisce significativamente rispetto al gruppo L1 M 1, per cui anche in questo caso l'aggiunta di melatonina 1 mM non è vantaggiosa.

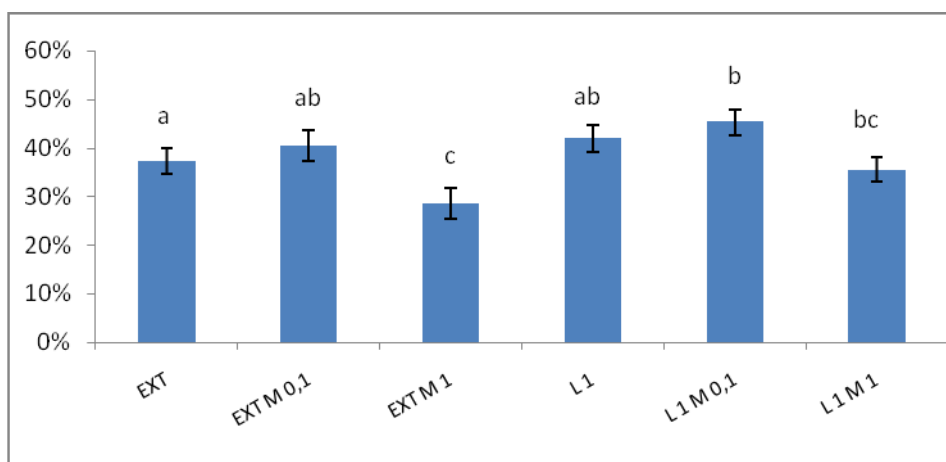


Figura 34. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'associazione lecitina melatonina non apporta benefici sul parametro preso in esame.

9.3 Motilità progressiva e rapidi

Per quanto riguarda i motili progressivi il gruppo EXT non presenta differenza statisticamente significativa rispetto ai gruppi EXT M 0,1 e EXT M 1, che non differiscono fra loro. La presenza di melatonina nell'extender senza lecitina non migliora il parametro analizzato. Il gruppo L 1 differisce significativamente dagli altri gruppi ($P=0$) presentando i valori medi più alti ($29 \pm 2\%$), tranne che dal gruppo L 1 M 0,1 che ha sua volta non presenta differenza rispetto al gruppo L 1 M 1. Il gruppo L 1 M 1 ($21 \pm 2\%$) mostra differenza significativa ($P=0$) rispetto al gruppo L 1. L'aggiunta di melatonina all'extender lecitina non migliora la motilità.

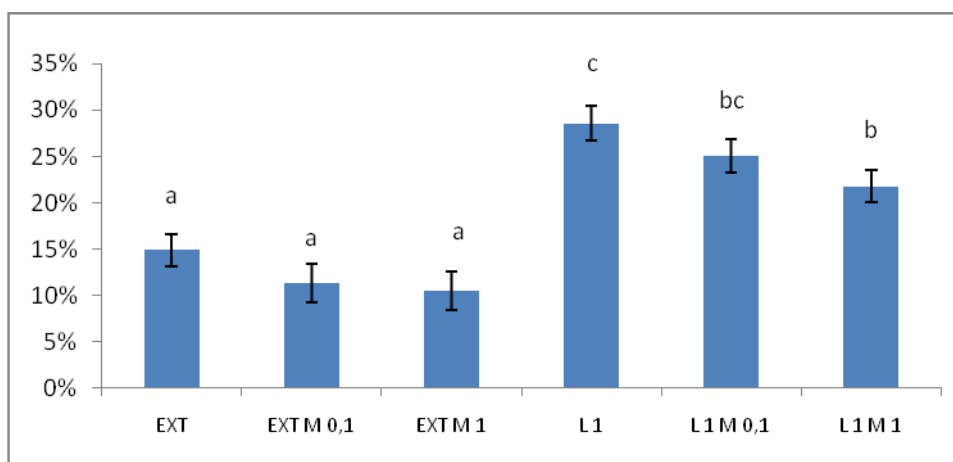


Figura 35. Molitità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'associazione lecitina melatonina non migliora il parametro preso in esame.

Per quanto riguarda i rapidi si può notare che non esiste una differenza statisticamente significativa fra i gruppi EXT M 0,1 e EXT M 1. Inoltre i gruppi L 1 e L 1 M 0,1 non differiscono significativamente, mentre i gruppi L 1 e L 1 M 1 presentano differenza ($P=0$), con i valori medi più bassi riportati dal gruppi L 1 M 1. L'aggiunta di melatonina 0,1 M all'extender lecitina non modifica il parametro, mentre l'addizione di melatonina 1 M lo peggiora.

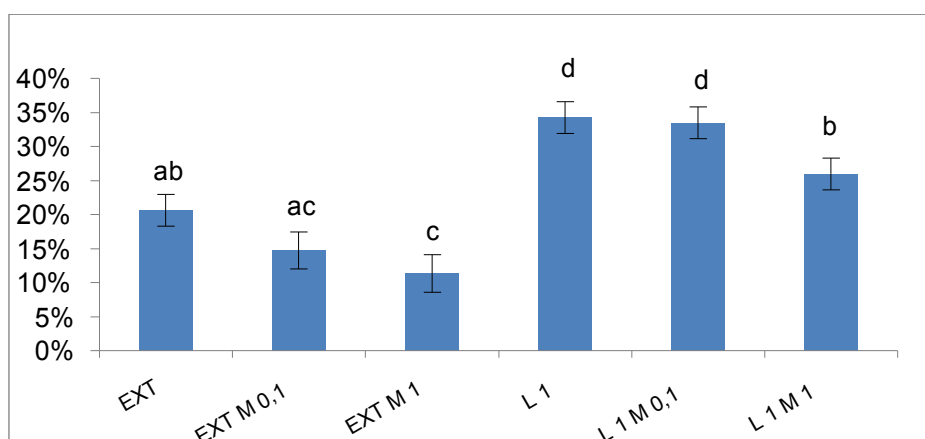


Figura 36. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'associazione lecitina melatonina non migliora il parametro preso in esame.

9.4 Livelli di ATP

I gruppi L 1, EXT M 0,1 e EXT M 1 non presentano differenza statisticamente significativa fra loro e mostrano i valori più alti. Il gruppo EXT non differisce dai gruppi L1, EXT M 0,1 e EXT M 1 ($P=0,0066$), che fra loro non presentano differenze significative. Il gruppo EXT inoltre non differisce significativamente rispetto ai gruppi EXT M 1, L1 M 0,1 e L1 M 1. La presenza di melatonina sia nell'extender base che in quello con lecitina non migliora i livelli di ATP.

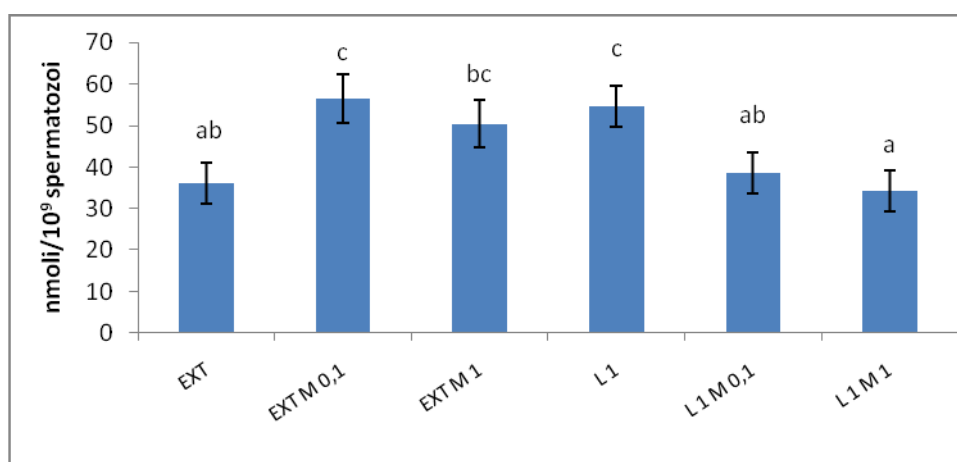


Figura 37. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. La melatonina non influenza il contenuto di ATP intracellulare.

9.5 Antiossidanti

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi nei dosaggi dei tioli totali e del GSH. Per quanto riguarda la capacità antiossidante totale solo il gruppo EXT M 0,1 mostra differenza significativa rispetto agli altri gruppi ($P=0,0198$) e presenta i valori medi più alti ($3,86 \pm 0,343 \mu\text{moli Trolox}/10^9$ spermatozoi).

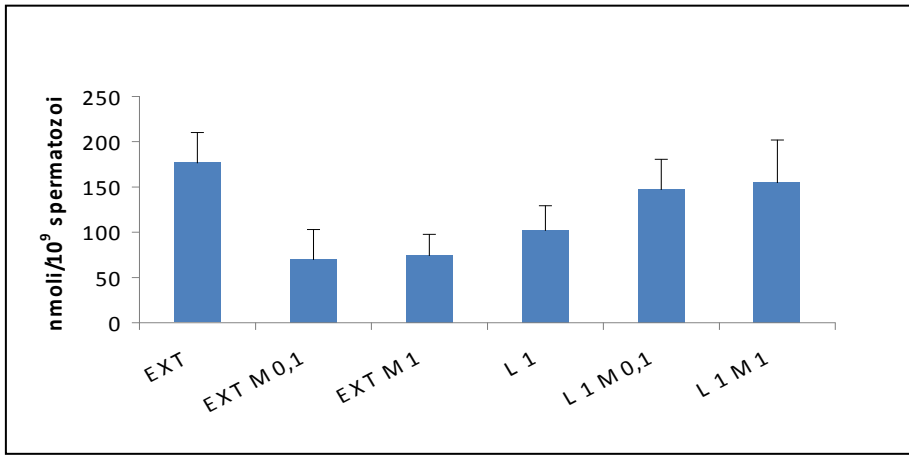


Figura 38. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

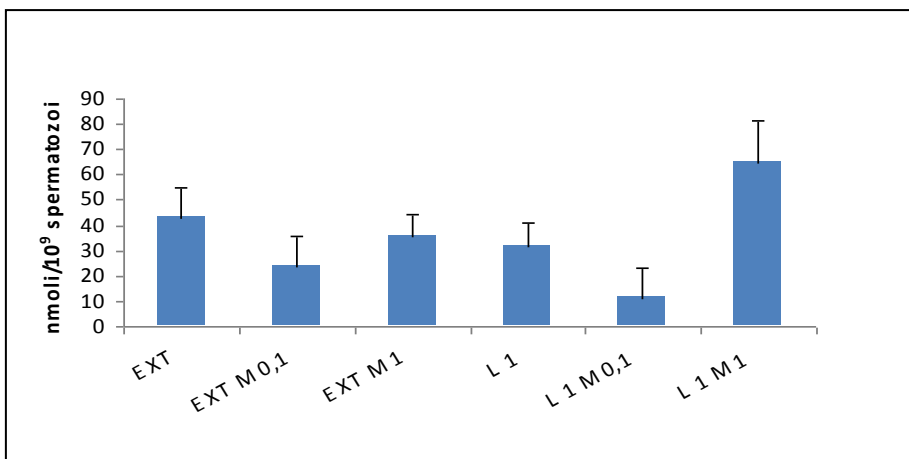


Figura 39. Glutazione nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. I gruppi non mostrano differenza dignificativa fra loro.

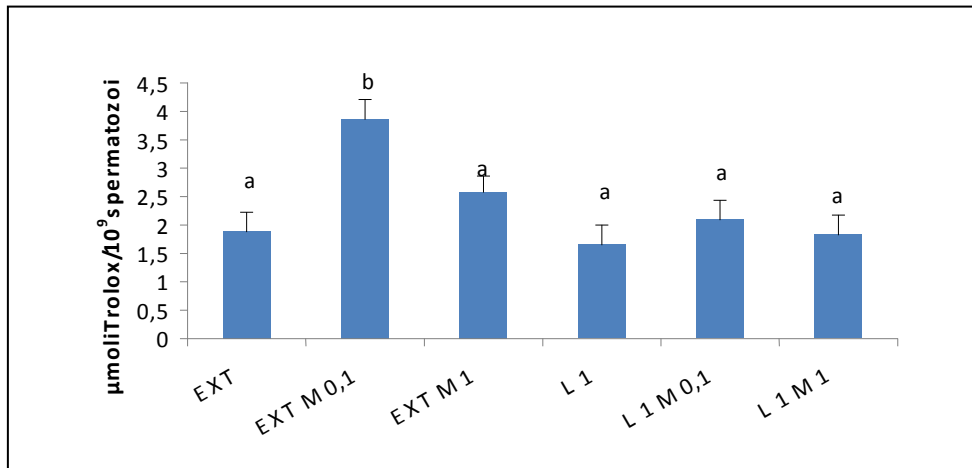


Figura 40: Capacità antiossidante totale nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. Il gruppo EXT M 0,1 è significativamente superiore a tutti gli altri gruppi.

10. RISULTATI 7° ESPERIMENTO

UTILIZZO DELLE DIVERSE CONCENTRAZIONI DI COLESTEROLO

10.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	88.5±4.2
CASA	Motili progressivi (%)	56±2.6
Parametri		
di motilità	Rapidi (%)	77±3.4
	Concentrazione di ATP	
	(nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	127±7.5

Tabella 7. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

10.2 Vitalità spermatica

Il gruppo C 4,5 mostra i valori medi più alti ($51 \pm 5\%$) e non presenta differenza statisticamente significativa rispetto ai gruppi C 1,5; C 3; C 3,75 e C 5, 25; mentre differisce significativamente rispetto ai gruppi EXT, che da i valori medi più bassi ($24 \pm 4\%$), C 0,75 e C 2,25.

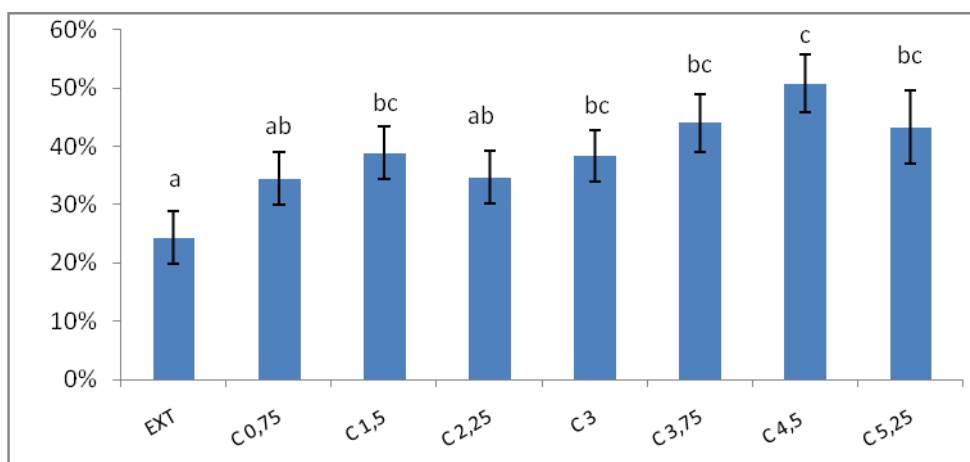


Figura 41. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender colesterolo è migliore del controllo.

10.3 *Motilità progressiva e rapidi*

Il gruppo C 4,5 presenta i valori medi più alti ($25 \pm 2\%$) e non mostra differenza statisticamente significativa rispetto ai gruppi C 1,5; C 3,75 e C 5, 25; mentre differisce rispetto agli altri gruppi ($P=0,0003$). Il gruppo EXT da i valori medi più bassi ($10 \pm 2\%$).

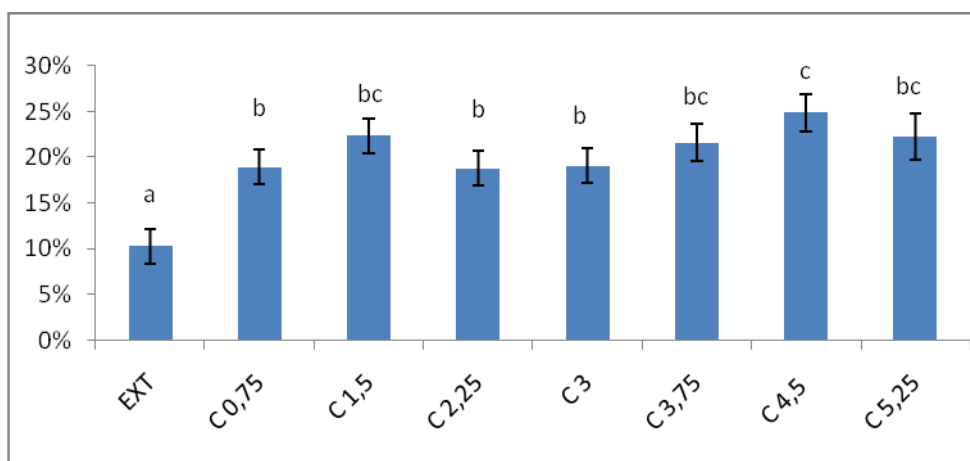


Figura 42. Molitità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender colesterolo 4,5 presenta i valori medi più alti.

Per quanto riguarda i rapidi il gruppo EXT mostra differenza statisticamente significativa rispetto agli altri gruppi ($P=0,0156$), che fra loro non presentano differenze. Il gruppo EXT mostra i valori medi più bassi ($17 \pm 3\%$).

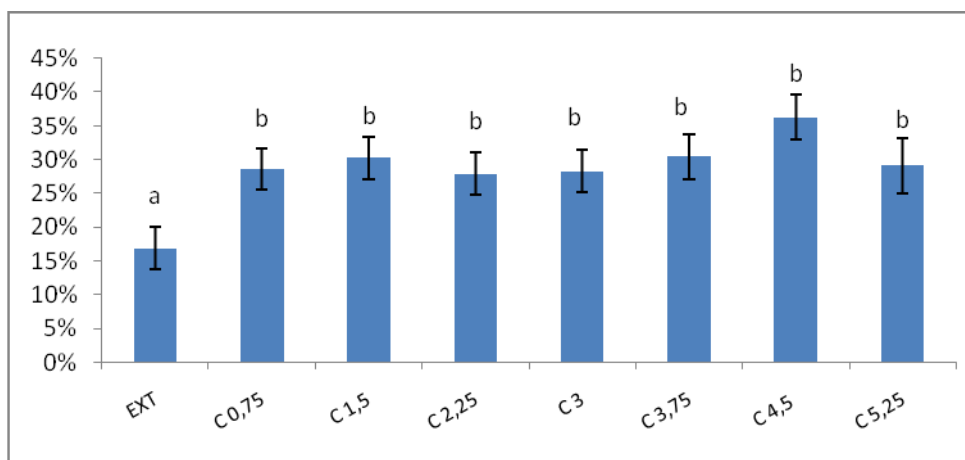


Figura 43. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

10.4 Livelli di ATP

I vari gruppi non presentano differenza statisticamente significativa fra loro, tranne il gruppo C 4,5 che differisce rispetto ai gruppi C 0,75 e C 5,25 e presenta i valori medi più alti ($53,08 \pm 6,58$ nmol ATP/ 10^9 spermatozoi).

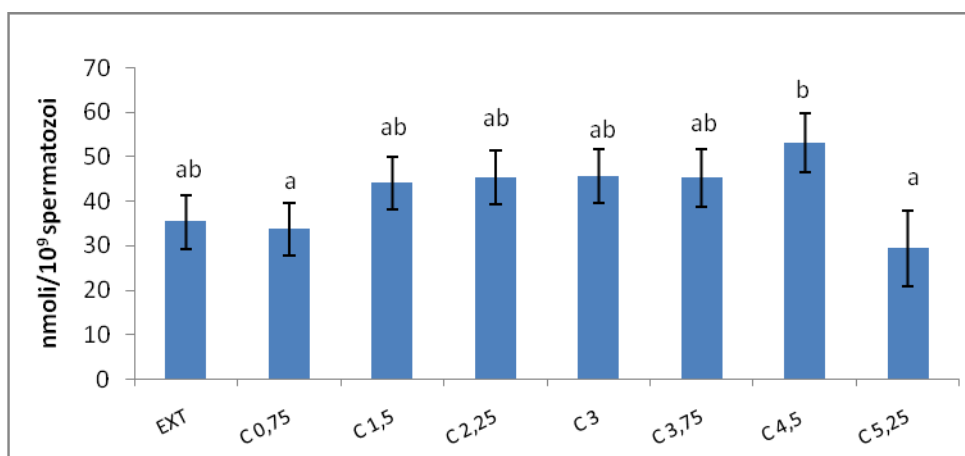


Figura 44. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco.

10.5 Antiossidanti

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi nei dosaggi dei tioli totali e del GSH. Per quanto riguarda la capacità antiossidante totale il gruppo EXT mostra differenza significativa rispetto agli altri gruppi ($P=0,000$) e presenta i valori più alti ($2,638 \pm 0,123 \mu\text{moli}/10^9$ spermatozoi). Il gruppo C 1,5 non differisce significativamente rispetto al gruppo C 3, mentre mostra differenza rispetto a tutti gli altri.

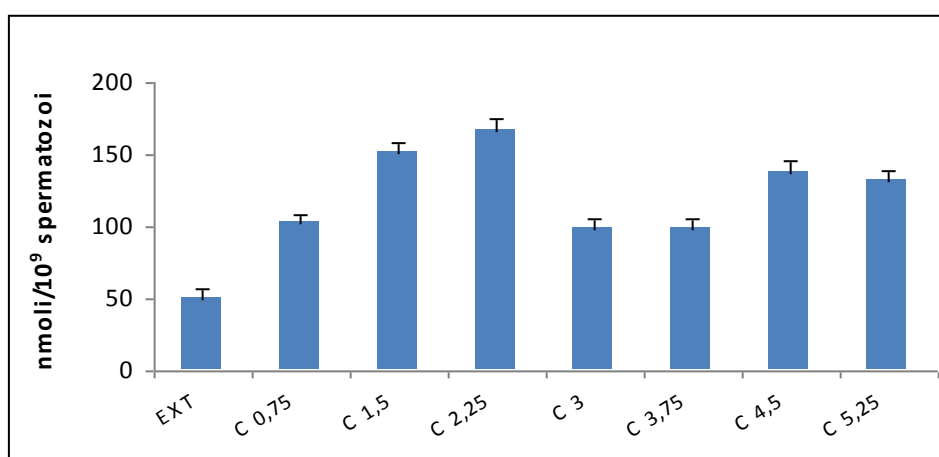


Figura 45. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

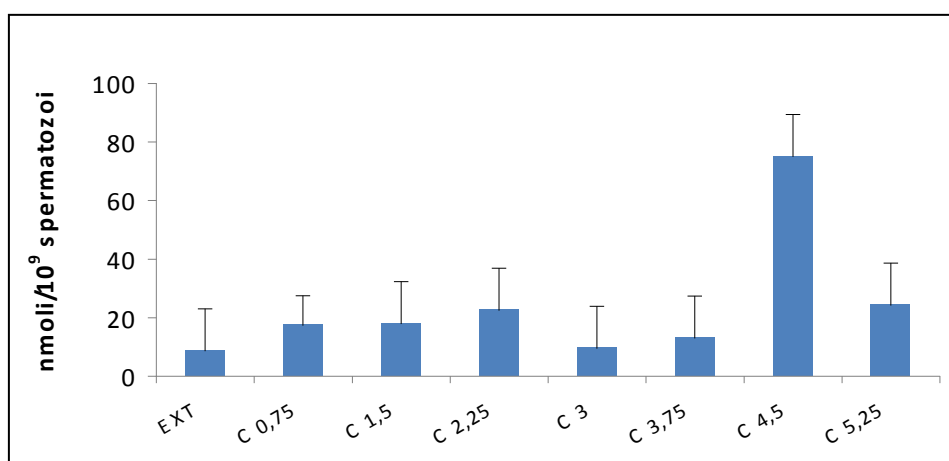


Figura 46. Glutatione nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

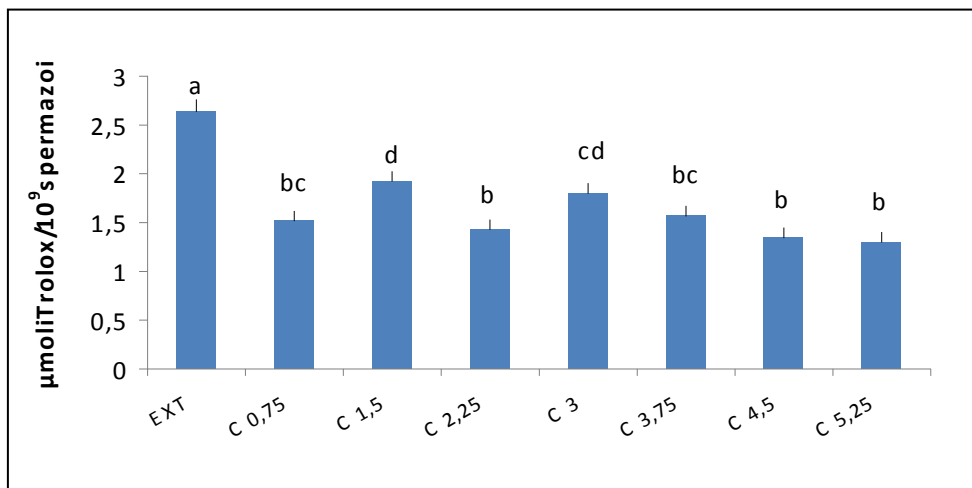


Figura 47: Capacità antiossidante totale nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

11. RISULTATI 8° ESPERIMENTO

UTILIZZO DEL COLESTEROLO CON LA MELATONINA

11.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	79±3.3
CASA	Motili progressivi (%)	49.9±3.4
Parame		
tri di	Rapidi (%)	69.4±3.4
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	109±13.6

Tabella 8. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

11.2 Vitalità spermatica

I tre gruppi EXT, C 4,5 e C 4,5 M 0,1 non mostrano differenza statisticamente significativa (P=0,3231). La presenza di melatonina addizionata all'extender colesterolo non migliora il parametro vitalità.

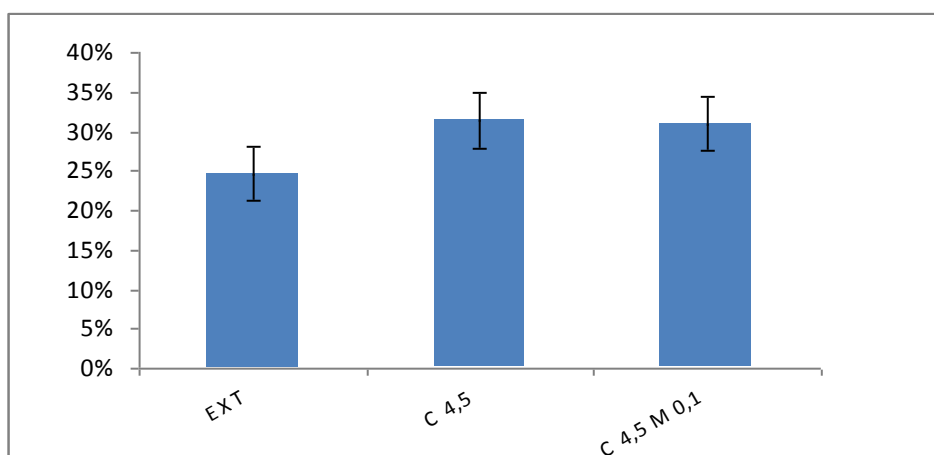


Figura 48. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

11.3 Motilità progressiva e rapidi

Per quanto riguarda i motili progressivi e i rapidi il gruppo C 4,5 mostra differenza statisticamente significativa rispetto agli altri gruppi ($P=0,0317$ per i motili e $P=0,016$ per i rapidi), con i valori medi più alti ($22 \pm 3\%$ per i motili e $27\% \pm 3\%$ per i rapidi). La presenza di melatonina addizionata all'extender colesterolo non migliora i parametri presi in esame, ma il gruppo C 4,5 risulta superiore al controllo (EXT).

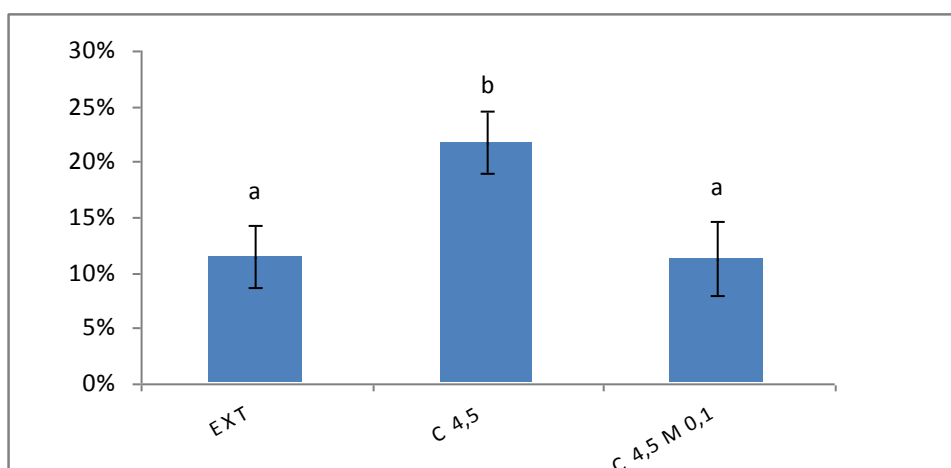


Figura 49. Molitità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender colesterolo 4,5 è significativamente migliore degli altri gruppi ($P=0,0317$).

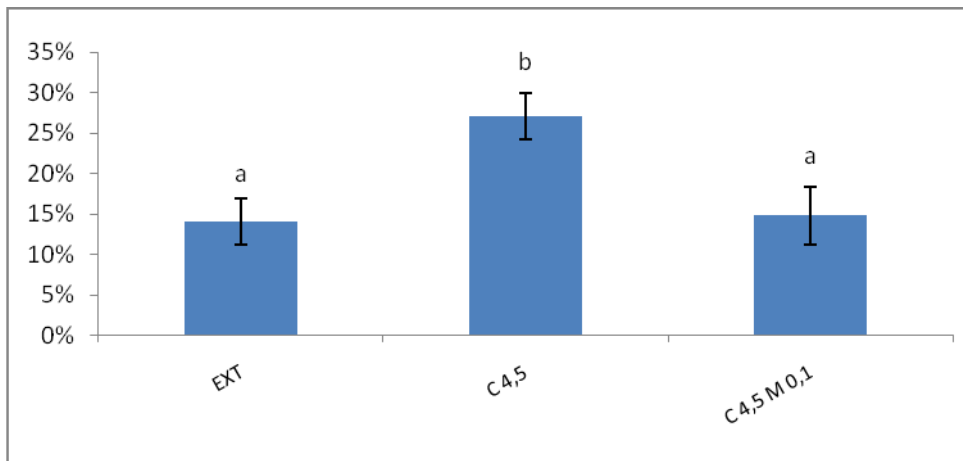


Figura 50. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

11.4 Livelli di ATP

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi (P=0,4532).

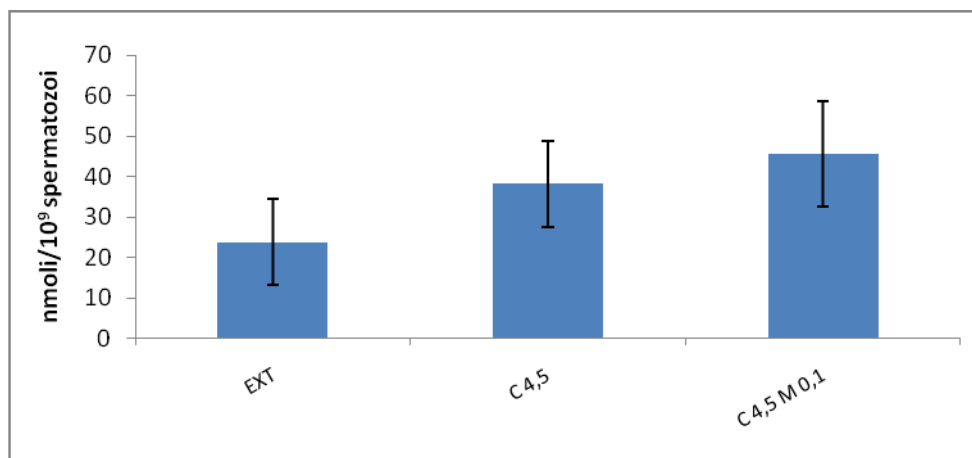


Figura 51. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco.

12. RISULTATI 9° ESPERIMENTO

UTILIZZO DELLA LECITINA COL TREALOSIO IN CONGELAMENTO

12.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

Vitalità (%)		87.7±4.8
CASA	Motili progressivi (%)	61±2.1
Parame		
tri di	Rapidi (%)	78±3.1
motilità		
Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)		173±10.2

Tabella 9. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento

12.2 Vitalità spermatica

Non sono state evidenziate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi (P=0,1564).

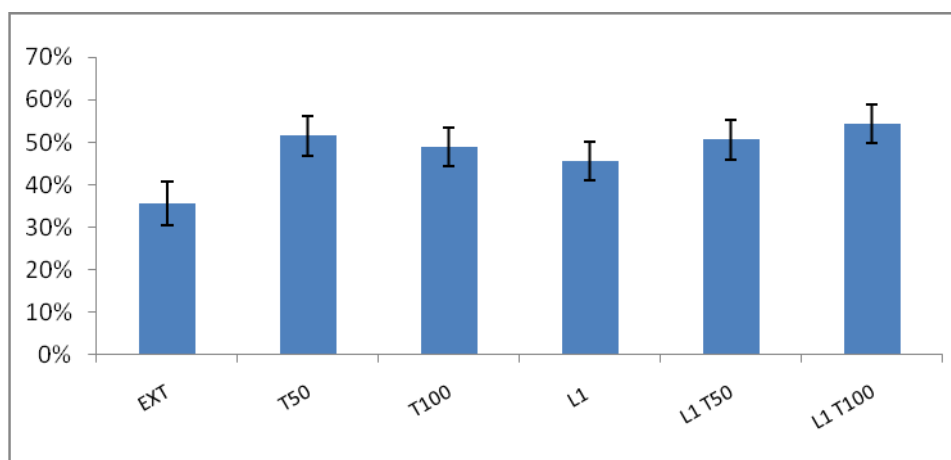


Figura 52. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

12.3 Motilità progressiva e rapidi

Per quanto riguarda i motili progressivi i gruppi EXT, EXT T 50 ed EXT T 100 non hanno mostrato differenza statisticamente significativa, per cui la presenza di solo trealosio addizionato all'extender base non apporta effetti positivi. Il gruppo L1 T 50 mostra differenza significativa rispetto ai tre gruppi precedenti ($P=0,0061$) ma non differisce significativamente rispetto ai gruppi L 1 T 100 e L 1, anche se presenta i valori medi più alti ($28 \pm 2\%$) ed è migliore del controllo (EXT).

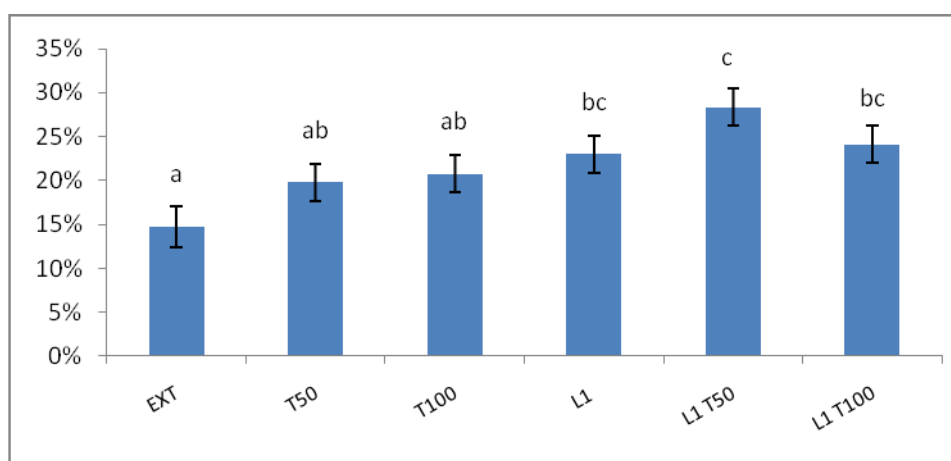


Figura 53. Motilità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender lecitina 1% è significativamente migliore del controllo. L'extender lecitina 1% trealosio 50mM mostra i valori più alti rispetto a tutti gli altri gruppi.

Per quanto riguarda i rapidi non ci sono differenze statisticamente significative fra i gruppi EXT, EXT T 50 ed EXT T 100, per cui anche in questo caso la presenza di trealosio nell'extender base non migliora il parametro rispetto al controllo (EXT). Il gruppo L 1 T 50 mostra differenza significativa rispetto agli altri ($P=0,0007$), tranne che al gruppo L 1, ma presenta i valori medi più alti ($39 \pm 3\%$) ed è migliore del controllo. L'extender lecitina trealosio 50 mM offre risultati migliori rispetto al solo extender e al gruppo lecitina trealosio

100 mM.

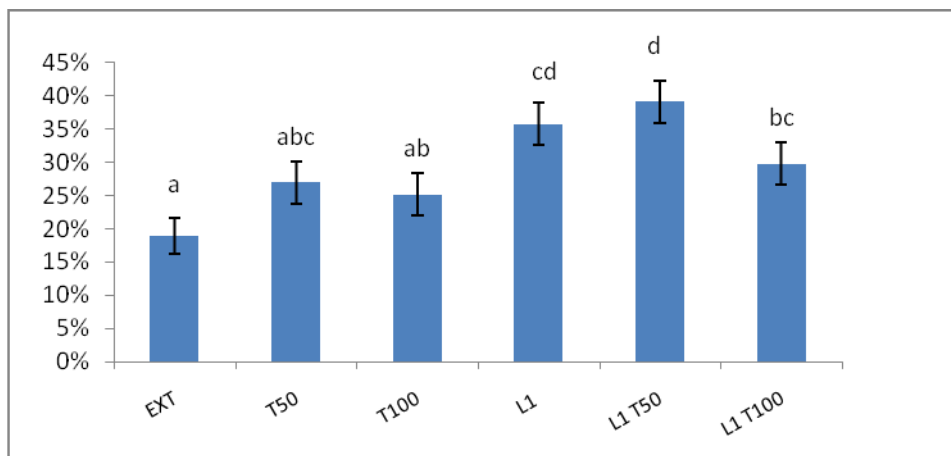


Figura 54. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender lecitina 1% è significativamente migliore del controllo.

12.4 Livelli di ATP

I gruppi EXT, EXT T 50 ed EXT T 100 non mostrano differenze statisticamente significative fra loro e rispetto al gruppo L1, che a sua volta non differisce significativamente rispetto al gruppo L T 50. Il gruppo L T 100 presenta differenza rispetto agli altri gruppi ($P=0,0008$), con i valori medi più alti ($103 \pm 10,33$ nmol ATP/ 10^9 spermatozoi). L'aggiunta di trealosio 100 mM all'extender lecitina incrementa i livelli di ATP.

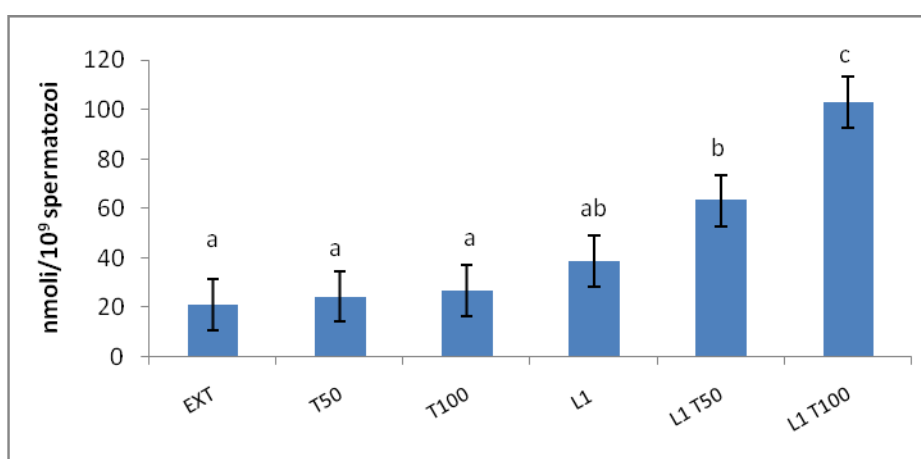


Figura 55. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. L'extender lecitina 1% trealosio 100 mM incrementa significativamente i livelli di ATP.

12.5 Antiossidanti

Per quanto riguarda il dosaggio dei tioli totali i gruppi EXT, L 1 e EXT T 100 mostrano differenze statisticamente significative fra loro e rispetto a tutti gli altri gruppi ($P=0,000$), col valore medio più alto riscontrato nel gruppo EXT T 100 ($318,9 \pm 8,26\text{nmoli}/10^9$ spermatozoi). I gruppi L 1 T 50, L 1 T 100 e EXT T 50 non differiscono significativamente.

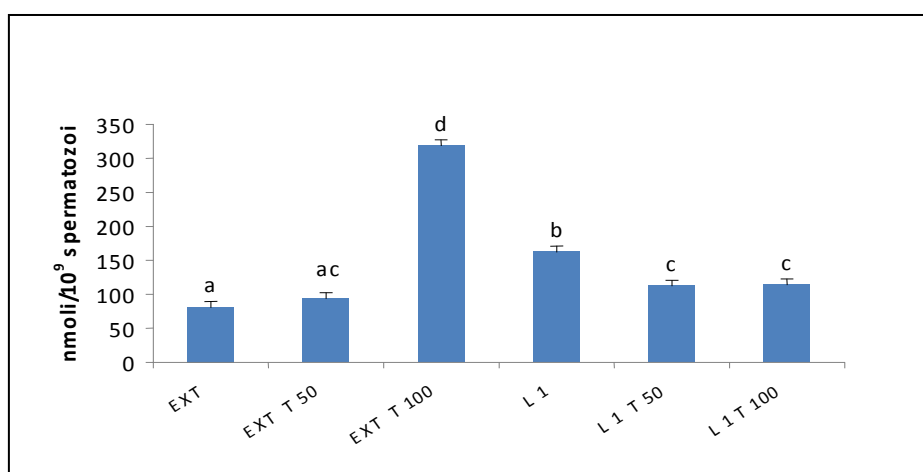


Figura 56. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender lecitina 1% con e senza trealosio è significativamente migliore del controllo.

Per quanto riguarda il dosaggio del GSH i gruppi EXT e L 1 T 100 non presentano differenza statisticamente significativa, così come i gruppi L 1 e L 1 T 50 e i gruppi EXT T 100 e EXT T 50. Queste coppie di gruppi differiscono significativamente fra loro ($P=0,0025$).

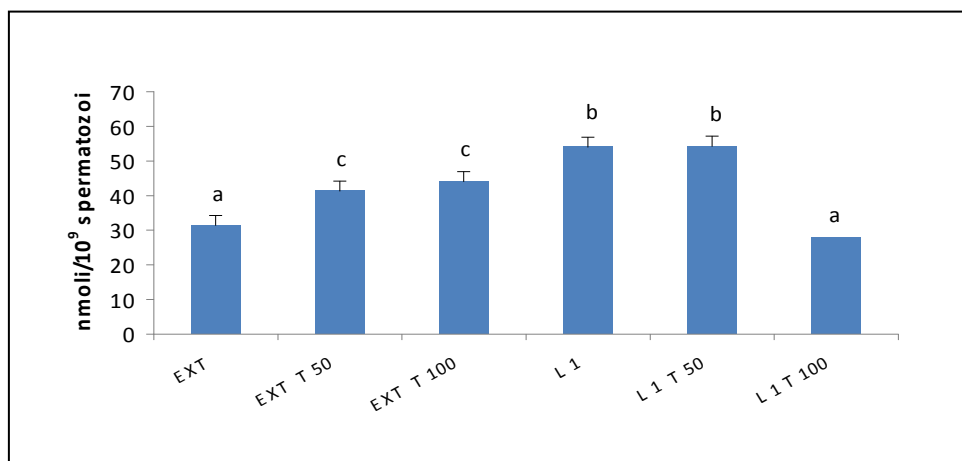


Figura 57. Glutazione nel seme di becco post congelamento e scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender lecitina 1% con e senza trealosio 50 mM è significativamente migliore del controllo.

Per quanto riguarda il dosaggio della capacità antiossidante totale il gruppo L 1 non mostra differenza statisticamente significativa dal gruppo EXT, ma differisce rispetto a tutti gli altri gruppi, col valore più basso ($0,28 \pm 0,15 \mu\text{moli}/10^9$ spermatozo).

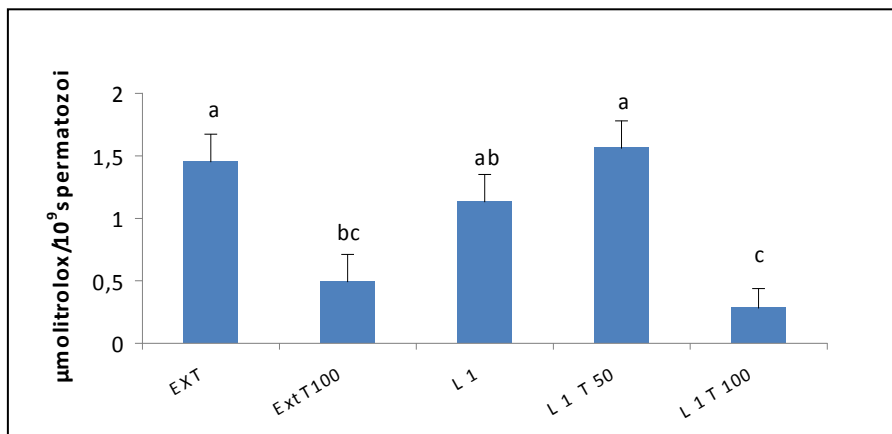


Figura 58: Capacità antiossidante totale nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

13. RISULTATI 10° ESPERIMENTO

UTILIZZO DEL COLESTEROLO COL TREALOSIO IN CONGELAMENTO

13.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	90.6±3.5
CASA	Motili progressivi (%)	51±2.8
Parame		
tri di	Rapidi (%)	77±2.7
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	121.3±9.5

Tabella 10. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

13.2 Vitalità spermatica

I gruppi non presentano differenze statisticamente significative fra loro, tranne il gruppo EXT che differisce significativamente dai gruppi EXT T 100; C 4,5 T 50 e C 4,5 T 100 (P=0,0228) e mostra i valori medi più bassi ($34 \pm 3\%$), mentre non presenta differenza significativa rispetto ai gruppi EXT T 50 e C 4,5. Il gruppo C 4,5 T 50 mostra i valori medi più alti ($54 \pm 4\%$).

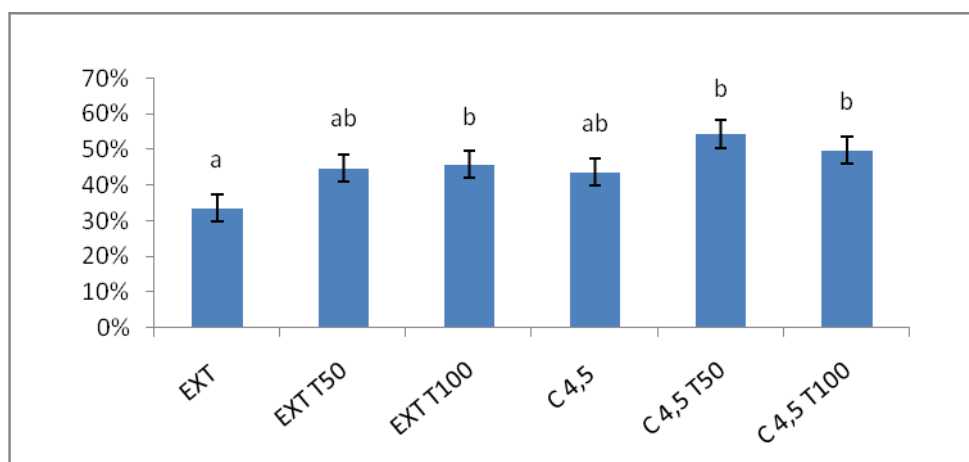


Figura 59. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

13.3 Motilità progressiva e rapida

Per quanto riguarda i motili progressivi non è stata riscontrata differenza statisticamente significativa fra i gruppi.

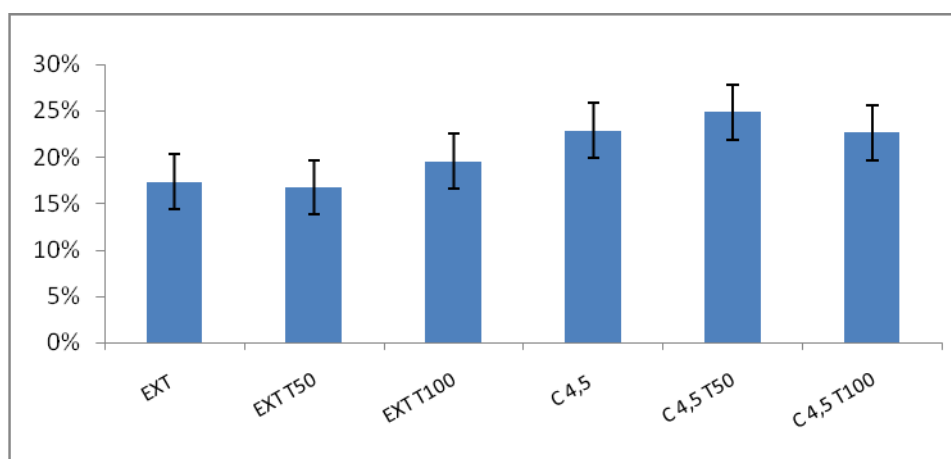


Figura 60. Molitità del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

Per quanto riguarda i rapidi i gruppi non differiscono significativamente fra loro, tranne il gruppo C 4,5 T 50 che mostra differenza rispetto ai gruppi senza colesterolo EXT, EXT T 50 e EXT T 100. (P=0,0513). Il gruppo C 4,5 T 50 non presenta differenza significativa rispetto ai gruppi C 4,5 e C 4,5 T 100, ma mostra i valori medi più alti ($31 \pm 3\%$).

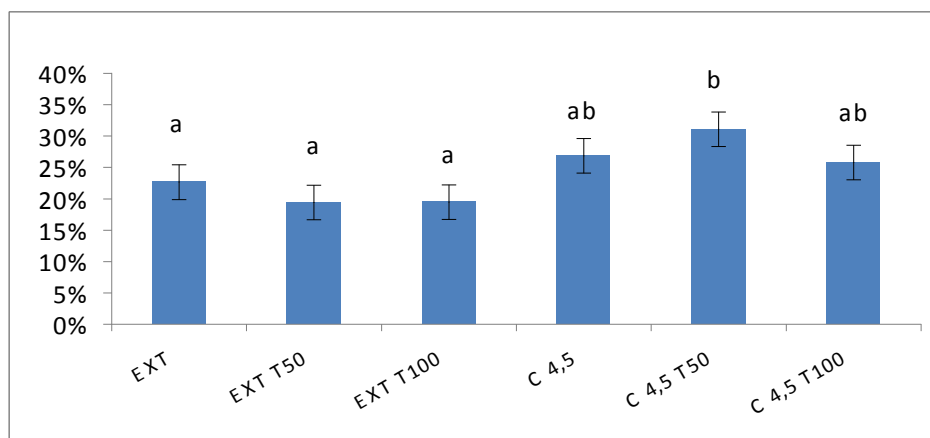


Figura 61. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender colesterolo 4,5 trealosio 50 mM è significativamente migliore del controllo.

13.4 Livelli di ATP

Non è stata riscontrata differenza statisticamente significativa fra i gruppi.

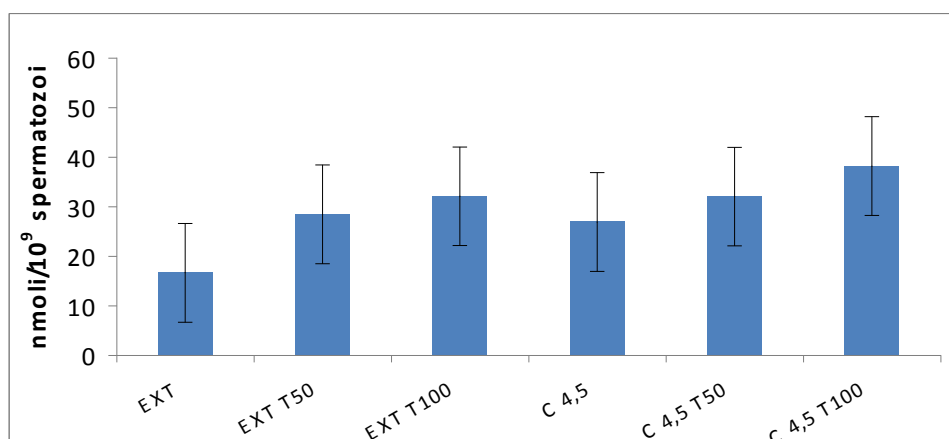


Figura 62. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco.

13.5 Antiossidanti

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi nei dosaggi della capacità antiossidante totale, dei tioli totali e del GSH.

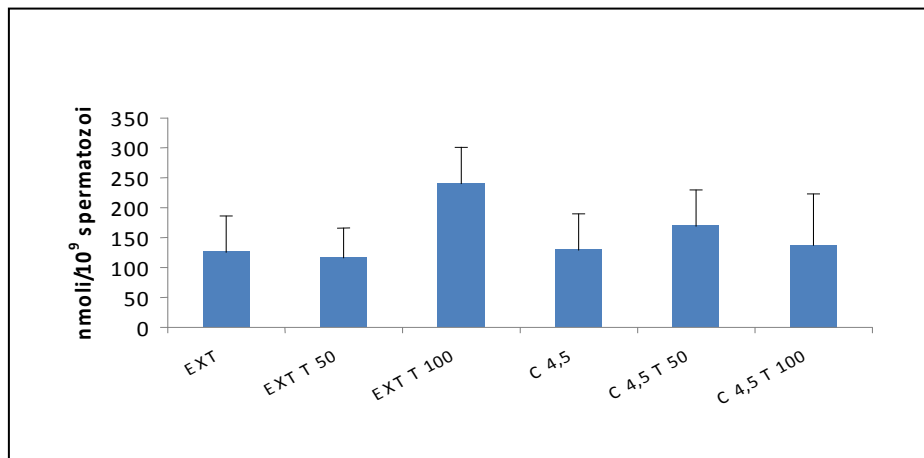


Figura 63. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

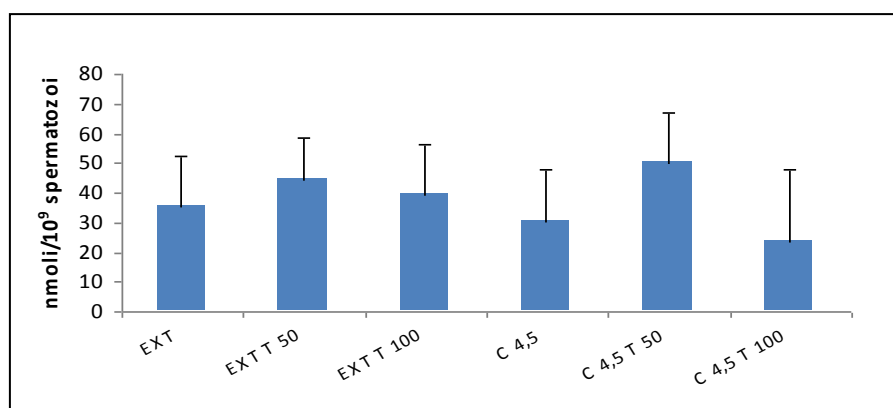


Figura 64. Glutazione nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

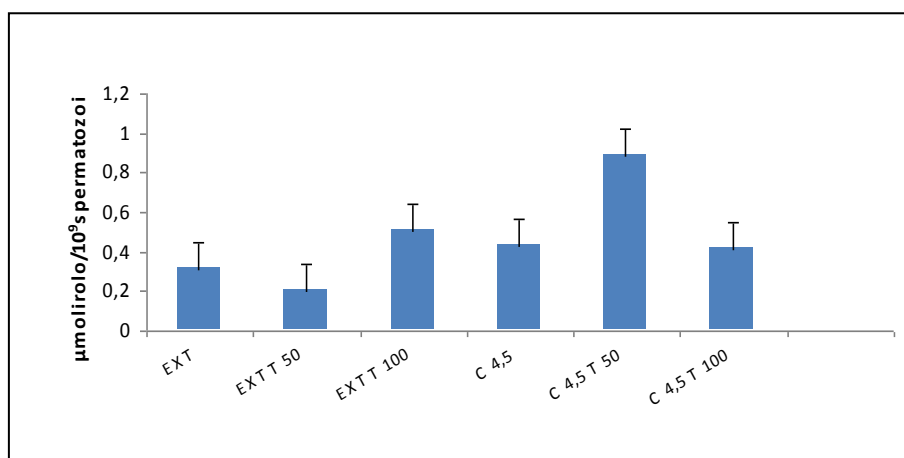


Figura 65: Capacità antiossidante totale nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

14. RISULTATI 11° ESPERIMENTO

UTILIZZO DELLE MIGLIORI CONCENTRAZIONI DI LECITINA E COLESTEROLO ASSOCIATI E NON AL TREALOSIO, CONFRONTATE CON L'EXTENDER TUORLO E UN EXTENDER COMMERCIALE.

14.1 Seme fresco

Il seme utilizzato per questo esperimento proveniva da un pool ottenuto da cinque eiaculati di cinque soggetti diversi e presentava le seguenti caratteristiche:

	Vitalità (%)	87±3
CASA	Motili progressivi (%)	50.3±2.5
Parame		
tri di	Rapidi (%)	78.3±3.2
motilità		
	Concentrazione di ATP (nmolATP/10 ⁹ spermatozoi)	167±15.1

Tabella 11. Caratteristiche dell'eiaculato fresco di becco utilizzato per l'esperimento.

14.2 Vitalità spermatica

I gruppi EXT e EXT T presentano differenza statisticamente significativa fra loro (P=0) e rispetto agli altri gruppi, che invece non differiscono significativamente fra loro. Il gruppo EXT da i valori medi più bassi (25 ± 3%) e il gruppo EXT T i valori medi più alti (56 ± 3%). Fra gli altri gruppi i valori medi migliori sono dati dal gruppo L1 (47 ± 3%).

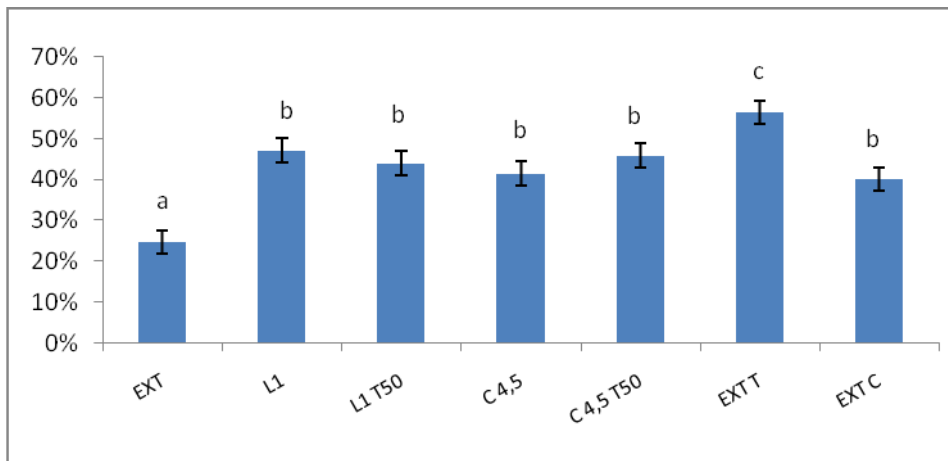


Figura 66. Vitalità del seme di becco post congelamento e scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

14.3 Motilità progressiva e rapidi

Per quanto riguarda i motili progressivi i gruppi EXT, L 1, EXT T e EXT C presentano differenza statisticamente significativa fra loro ($P=0$). Il gruppo EXT T mostra i valori medi più alti ($40 \pm 3\%$), seguito dal gruppo L 1 ($29 \pm 3\%$), dal gruppo EXT C ($20 \pm 3\%$) e dal gruppo EXT ($10 \pm 3\%$). Gli altri gruppi non differiscono significativamente fra loro e rispetto ai gruppi L 1 e EXT C. L'aggiunta di trealosio all'extender lecitina e all'extender colesterolo non migliora significativamente il parametro analizzato.

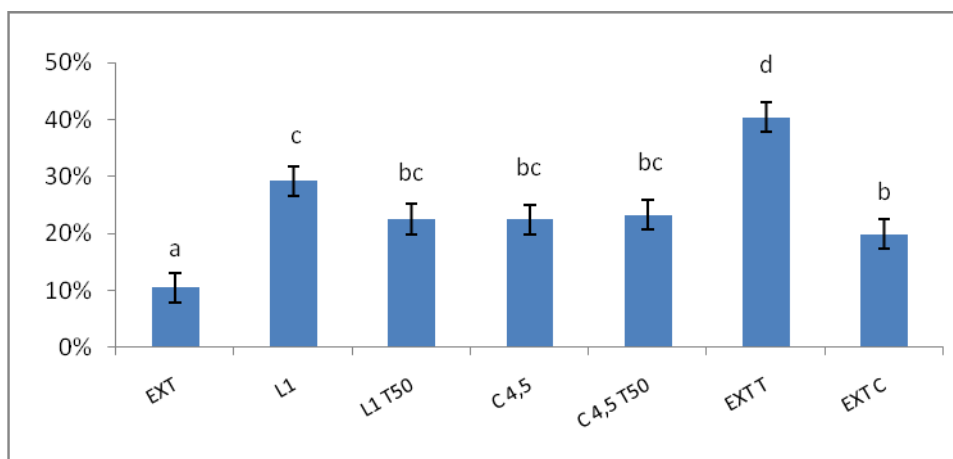


Figura 67. Molitità del seme di becco post congelamento e scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender lecitina 1% è significativamente migliore dell'extender commerciale e del controllo ($P=0$).

Per quanto riguarda i rapidi il gruppo EXT mostra differenza statisticamente significativa rispetto agli altri gruppi, con i valori medi più bassi ($16 \pm 3\%$) ($P=0$). I gruppi L 1; C 4,5; L1 T 50; C 4,5 T 50 non differiscono significativamente fra loro. Il gruppo EXT C ($28 \pm 3\%$) non presenta differenza rispetto ai gruppi C 4,5; L 1 T 50 e C 4,5 T 50 e da i valori medi più bassi dopo il controllo (EXT). Il gruppo L 1 non mostra differenza significativa rispetto al gruppo EXT T, che presenta i valori medi più alti ($51 \pm 3\%$), mentre differisce significativamente ($P=0$) dal gruppo EXT C mostrando i valori medi più alti ($42 \pm 3\%$). L'extender lecitina è migliore dell'extender commerciale sul parametro rapidi.

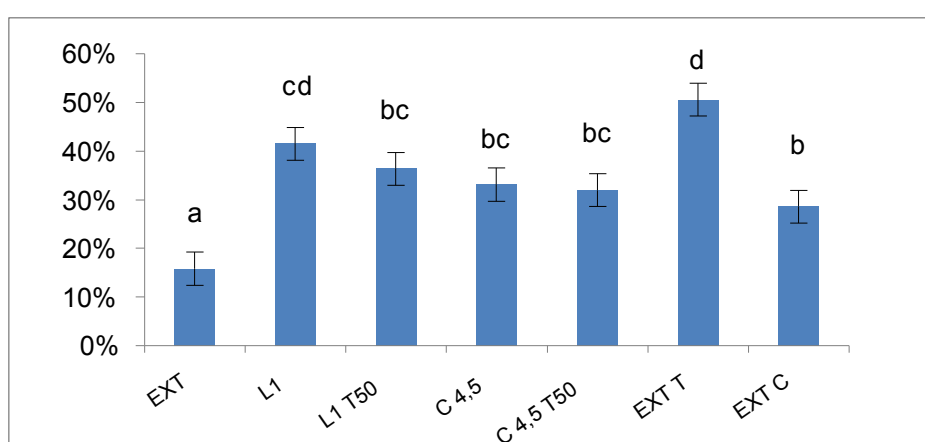


Figura 68. Percentuale di rapidi del seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi. L'extender lecitina 1% è significativamente migliore dell'extender commerciale e del controllo ($P=0$).

14.4 Livelli di ATP

Il gruppo EXT presenta differenza statisticamente significativa da tutti i gruppi ($P=0,0065$), tranne che dai gruppi C 4,5 e EXT C e presenta i valori medi più bassi ($0,93 \pm 0,16$ nmol ATP/ 10^9 spermatozoi). I gruppi L1; C 4,5; C 4,5 T 50; EXT T ed EXT C non mostrano differenza significativa fra loro. Il gruppo L 1 non differisce significativamente dai gruppi L T 50, C 4,5 T 50 ed EXT T.

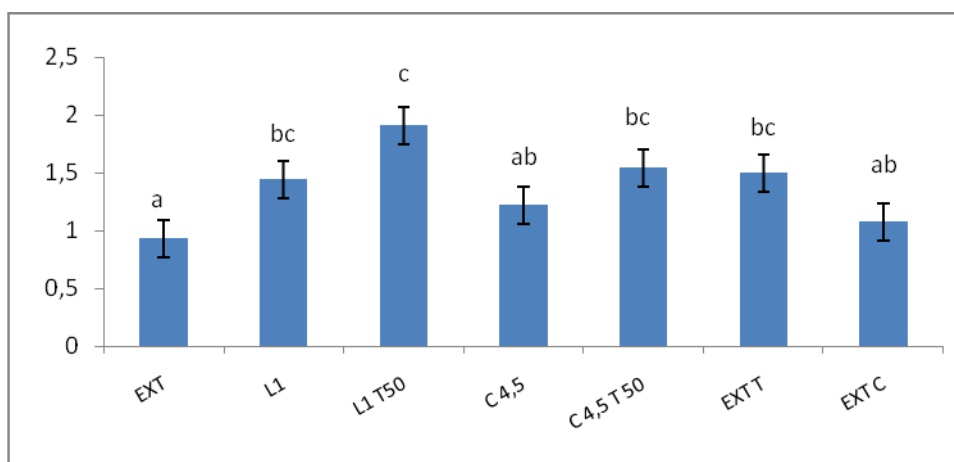


Figura 69. Effetto della crioconservazione sui livelli di ATP nel seme di becco. L'extender lecitina 1% è migliore del controllo (P=0,0065)

14.5 Antiossidanti

Non sono state rilevate differenze statisticamente significative fra i vari gruppi nei dosaggi dei tioli totali e del GSH.

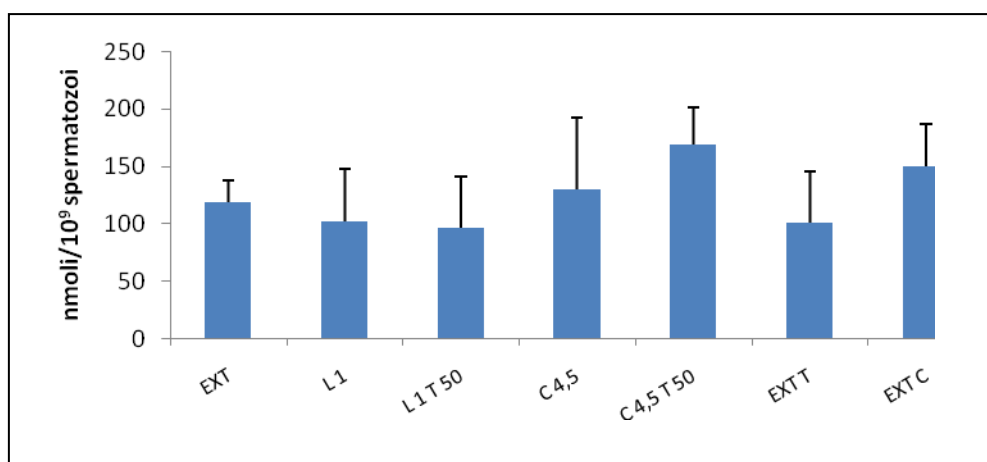


Figura 70. Livelli di tioli totali nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

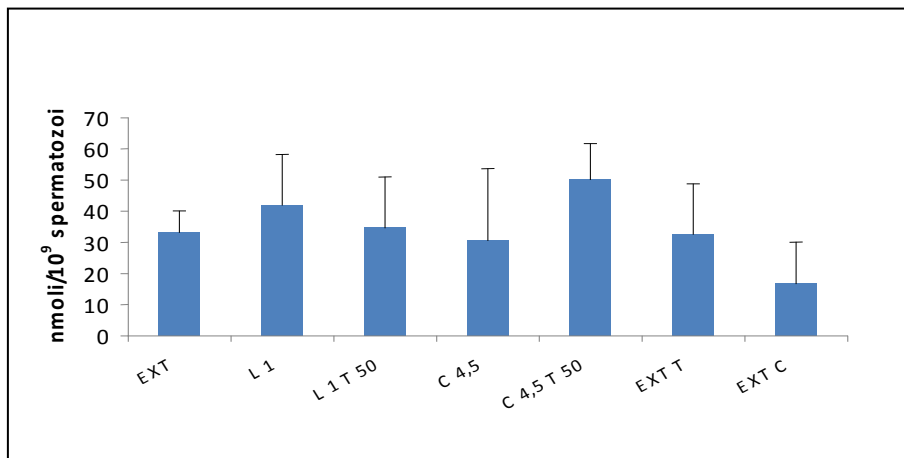


Figura 71. Glutazione nel seme di becco post congelamento e scongelato, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

Sulla capacità antiossidante totale i gruppi C 4,5; EXT C; L 1 e EXT T non presentano differenze statisticamente significative fra loro, ma differiscono significativamente dai gruppi EXT, C 4, 5 T 50 e L 1 T 50 (P=0,0135).

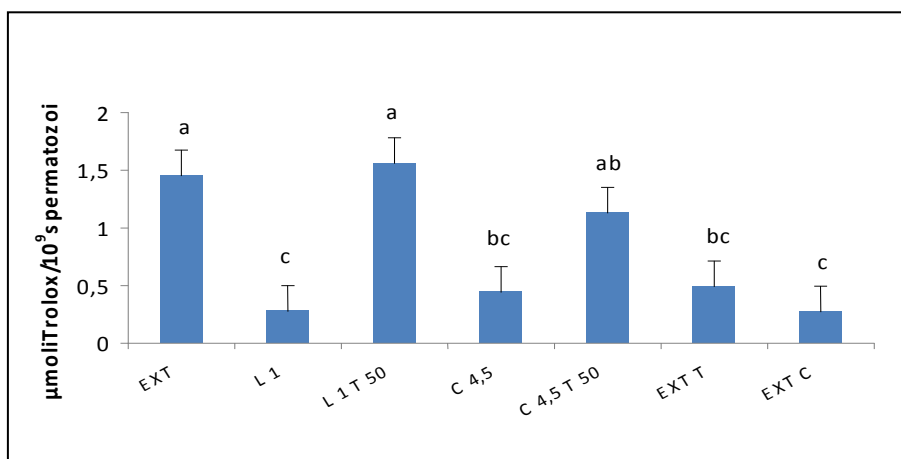


Figura 72: Capacità antiossidante totale nel seme post congelamento scongelamento, a seguito dell'utilizzo dei diversi gruppi.

14.6 Fertilizzazione eterologa

I risultati ottenuti dopo IVF sono riassunti nella tabella ... Il gruppo EXT (27/84 divisi) non differisce significativamente rispetto ai gruppi EXT C (32/82 divisi), EXT T (32/83 divisi), che non presentano fra loro differenza significativa. I gruppi L 1 (48/74 divisi) e L 1 T 50 (52/87) mostrano differenza statisticamente significativa (P=0,0012) rispetto ai gruppi

EXT C e EXT T, con i valori medi migliori riportati dal gruppo L 1 ($69 \pm 7\%$), seguito dal gruppo L 1 T 50 ($65 \pm 7\%$) e il maggiori numero di divisi in rapporto al numero totale di oociti fertilizzati.

GRUPPI	N° OOCITI	FECONDATI (% \pm errore standard)
Extender	84	27 ($32,6 \pm 5.2$) ^a
Lecitina	74	48 ($66,2 \pm 5.2$) ^d
Lecitina T 50	87	52 ($62,3 \pm 5.2$) ^{c,d}
Colesterolo	86	44 ($50,9 \pm 5.2$) ^{b,c,d}
Colesterolo T50	83	41 ($49,6 \pm 5.2$) ^{b,c}
Extender commerciale	82	32 ($39,3 \pm 5.2$) ^{a,b}
Tuorlo	83	32 ($38,6 \pm 5.2$) ^{a,b}

Tabella 12. Percentuali di fertilizzazione dopo fecondazione eterologa con seme di becco congelato con i differenti extenders. La % di fertilizzazione è significativamente superiore per il gruppo con extender lecitina 1% rispetto ai gruppi con extender tuorlo ed extender commerciale.

14.7 Frammentazione del DNA

14.7.1 Comet Ar

Per quanto riguarda l'area della comet non è stata evidenziata differenza statisticamente significativa fra i gruppo EXT; C 4,5; EXT C e C 4,5 T 50, quest'ultimo a sua volta non differisce significativamente dai gruppi L 1 e EXT T. L'area della comet è significativamente maggiore nel gruppo L 1 T 50 rispetto a tutti gli altri (P=0,001).

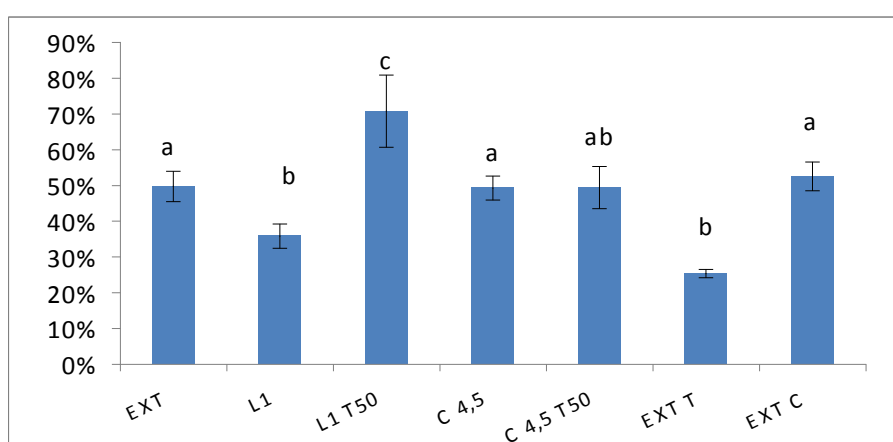


Figura 73. Percentuali dell'area della comet degli spermatozoi dopo congelamento e scongelamento con i differenti extenders.

14.7.2 Head DNA

Per quanto riguarda la percentuale di DNA nella testa della comet non è stata evidenziata differenza statisticamente significativa fra i gruppo.

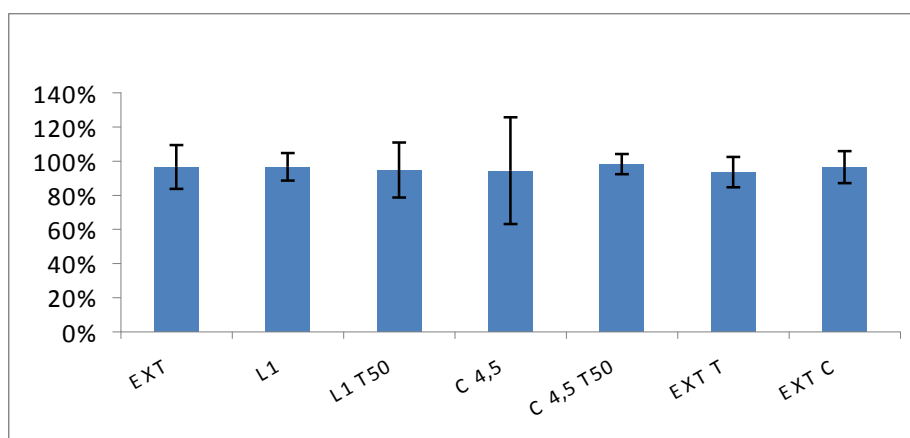


Figura 74. Percentuali di DNA nella testa della comet degli spermatozoi dopo congelamento e scongelamento con i differenti extenders.

14.7.3 Tail DNA

Per quanto riguarda la percentuale di DNA nella coda i gruppi che mostrano differenza statisticamente significativa sono il C 4,5 e C 4,5 T 50 rispetto a L 1 T 50 e EXT T.

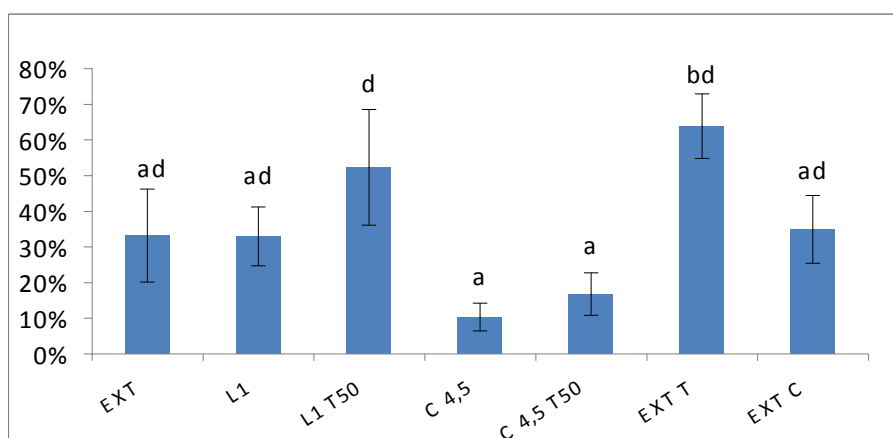


Figura 75. Percentuali di DNA nella coda della comet degli spermatozoi dopo congelamento e scongelamento con i differenti extenders.

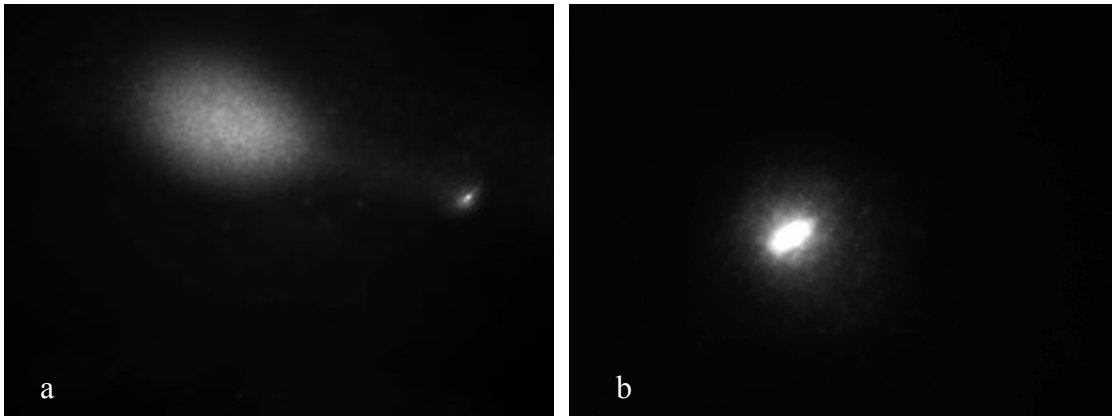


Immagine 6. Esempi di comete di spermatozoi dopo congelamento e scongelamento con DNA fortemente (a) e parzialmente (b) danneggiato.

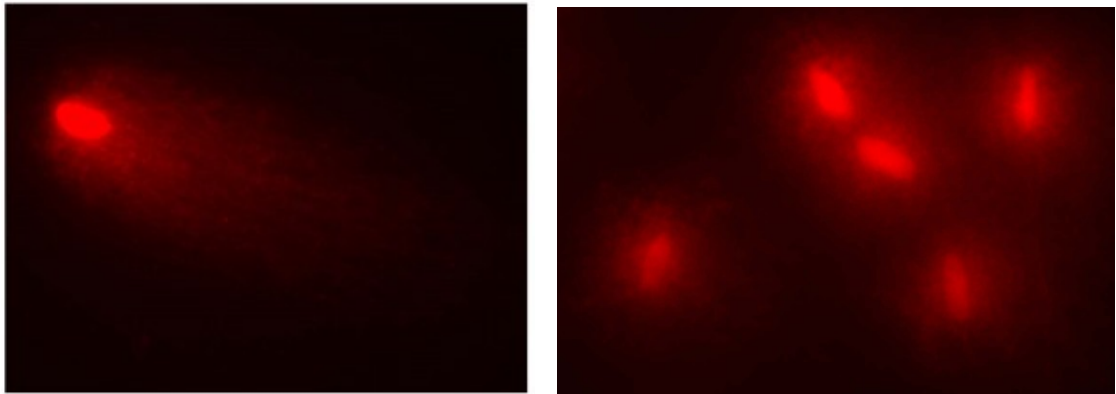


Immagine 7. Esempi di comete di spermatozoi dopo congelamento e scongelamento che mostrano diversi livelli di danno al DNA.

15. DISCUSSIONE

Il protocollo sperimentale usato in questo lavoro ha previsto tre fasi, nella prima sono state condotte delle prove di congelamento del seme per trovare la concentrazione migliore delle sostanze prese in esame (lecitina, colesterolo, trealosio e melatonina), nella seconda fase si è voluto provare a saggiare l'effetto combinato di alcune di queste fra loro, mentre nella terza fase i gruppi che hanno dato migliori risultati sono stati messi a confronto col tuorlo d'uovo, sia in prove di congelamento che di fertilizzazione eterologa in vitro, come previsto dallo scopo della tesi.

Sono stati presi in considerazione: la vitalità spermatica perchè il rapporto cellule vive/morte dopo scongelamento è essenziale per valutare la qualità del seme; la percentuale di spermatozoi motili progressivi e rapidi perché sono parametri fondamentali per predire la fertilità sia in vivo che in vitro e quindi la produzione di embrioni con seme congelato (Berlinguer *et al.*, 2009); il grado di frammentazione del DNA (tramite metodica Comet assay) in quanto anch'esso influenza la capacità fecondante in vitro del seme congelato (Berlinguer *et al.*, 2009) e la sua integrità è strettamente correlata al normale sviluppo dell'embrione; la produzione intracellulare di ATP perché come è noto il metabolismo energetico è uno dei fattori chiave che influenzano la funzionalità dello spermatozoo e l'ATP nel seme supporta molte attività della cellula come la motilità, la capacitazione e la reazione acrosomiale; infine la capacità antiossidante dal momento che il processo di congelamento riduce i livelli di antiossidanti nella cellula.

Inoltre è stata effettuata la prova di fecondazione perché, come ampiamente riportato (Berlinguer *et al.*, 2009), la fertilizzazione in vitro è la prova d'elezione per valutare della capacità fecondante del seme, permette di evidenziare l'interazione spermatozoo-oocita e consente la visualizzazione dei diversi stadi dello sviluppo embrionale precoce.

La prima sostanza presa in esame è stata la melatonina. Il suo ruolo nell'ambito della

crioconservazione del seme è stato discusso in diversi lavori (Shiu *et al.*, 2000; Casao *et al.*, 2010), che descrivono la sua presenza nel plasma seminale e l'esistenza di suoi recettori nel tessuto epididimale. Altri studi confermano gli effetti benefici della melatonina nel proteggere gli spermatozoi da diversi tipi di lesioni (Sarabia *et al.*, 2009; Casao *et al.*, 2010). Infatti lo shock da raffreddamento può danneggiare lo spermatozoo in diverse strutture, fra cui i mitocondri (Pena *et al.*, 2009) e la membrana acrosomiale (Meyeres, 2005) e può alterarne l'integrità funzionale riducendone la fertilità (Gillan e Maxwell, 1999). Inoltre è stata riportata una significativa riduzione degli antiossidanti presenti all'interno dello spermatozoo come causa di una maggiore suscettibilità di questa cellula alla perossidazione dopo crioconservazione (Bilodeau *et al.*, 2000).

Il primo esperimento condotto sulla melatonina ha avuto l'obiettivo di trovare una concentrazione ottimale partendo da un lavoro effettuato nel nostro laboratorio, nel quale un extender base al 20% di tuorlo d'uovo per il congelamento del seme di ariete è stato supplementato con diverse concentrazioni di melatonina (0,1; 1 e 10 mM), per valutarne la sua effettiva azione crioprotettiva (Succu *et al.*, 2011). Vista la scarsità di lavori riportati in letteratura sulla specie caprina circa la supplementazione dell'extender di congelamento del seme con melatonina, tenendo conto che questa specie è fortemente legata al fotoperiodo e che ci possono essere delle differenze non solo fra specie ma anche fra razze, nel presente lavoro le stesse concentrazioni utilizzate nell'ariete sono state testate nel becco di razza sarda (2° esperimento). I risultati sono stati discordanti, mostrando che in questa specie la melatonina non sortisce gli stessi effetti positivi riscontrati nell'ariete. Infatti, a differenza dell'ariete, dove la concentrazione di melatonina 1 mM ha mostrato i più alti valori in termini di vitalità, motilità totale e progressiva, spermatozoi rapidi, concentrazione intracellulare di ATP e integrità del DNA, nel becco la melatonina non ha dato benefici effetti su nessuno dei parametri: vitalità, motilità progressiva, rapidi e ATP, ma anzi alcuni valori riportati hanno

messo in evidenza che la presenza dell'antiossidante peggiora la qualità rispetto al controllo.

Si è voluto provare ad aggiungere la melatonina anche al trealosio in un extender base senza tuorlo d'uovo (3° esperimento), agli extenders lecitina 1% (6° esperimento) e colesterolo 4,5 mg/ml (7° esperimento), ma in nessuna delle tre prove è stato riscontrato effetto positivo sui parametri suddetti, dando conferma che nel becco la presenza dell'antiossidante non migliora la qualità neanche quando associato a queste altre sostanze. Le uniche differenze statisticamente significative sono state riscontrate nella prova col colesterolo, dove si è visto che sui parametri motili progressivi e rapidi l'extender colesterolo 4,5 mg/ml è risultato migliore dell'extender base controllo e dell'extender con melatonina 0,1 mM.

I risultati appaiono ancora più singolari se si tiene conto che il seme di becco viene congelato senza plasma (per la sua particolare composizione che ha effetti negativi sulla crioconservabilità) e in considerazione del fatto che il plasma seminale rappresenta un'importante fonte di antiossidanti, come dimostrato anche in altre specie fra cui il toro (Bilodeau *et al.*, 2000), per cui si sarebbe potuto ipotizzare un effetto benefico dell'aggiunta all'extender di un antiossidante come la melatonina, effetto che in realtà non è stato osservato.

D'altro canto però è stato riportato che la melatonina ha un effetto dose dipendente sulla funzionalità spermatica e in particolare sui parametri di motilità (Gwayi e Bernard, 2002), per cui si può ipotizzare che le concentrazioni utilizzate in questo lavoro (0,1; 1 e 10 mM) fossero troppo elevate per il becco. A questo proposito alcuni autori hanno riportato che, a differenza di quanto descritto nel lavoro effettuato nel nostro laboratorio (Succu *et al.*, 2011), nell'ariete la concentrazione 0,001 mM ha permesso di prevenire la capacitazione e modificazioni simil-apoptotiche degli spermatozoi (Casao *et al.*, 2010). E' risaputo inoltre che concentrazioni fisiologiche di ROS possono avere un ruolo critico nell'iperattivazione dello spermatozoo, nella capacitazione, nella reazione acrosomiale e nell'interazione oocita-spermatozoo (Aitken,

1995). Tuttavia un'eccessiva produzione di ROS può portare ad alti livelli di lipoperossidazione lipidica, ridurre la motilità spermatica e danneggiare la membrana acrosomiale (Alvarez e Storey, 1982, 1984). L'aggiunta di antiossidanti quindi da un lato potrebbe ridurre lo stress ossidativo, migliorando la qualità del seme in seguito al processo di congelamento-scongelo (Berra e Rizzo, 2009), ma dall'altro alte concentrazioni di antiossidanti potrebbero alterare i livelli fisiologici dei ROS agendo come proossidanti. Infatti un disequilibrio fra produzione di ROS e attività degli antiossidanti può causare il fallimento della funzionalità spermatica (Sikka, 1996). Questo concetto trova riscontro nei risultati ottenuti in questa tesi sul dosaggio della capacità antiossidante totale, dove è stato riscontrato che la concentrazione di melatonina 10 mM nell'extender al 20% di tuorlo d'uovo (2° esperimento) ha mostrato i valori più alti, ma non ha portato ad un miglioramento dei parametri di qualità del seme. Anche nella prova lecitina-melatonina (6° esperimento) la concentrazione di melatonina 0,1 mM ha dato i valori di capacità antiossidante totale maggiori rispetto agli altri gruppi, ma non ha presentato lo stesso riscontro sui parametri di qualità del seme.

L'altra sostanza presa in esame è stata il trealosio, disaccaride non permeabile presente in numerose piante ed animali. Il trealosio esercita la sua azione protettiva sugli spermatozoi preservando le componenti strutturali della membrana plasmatica, proteggendola dalla riduzione della temperatura e dai fenomeni di disidratazione, stabilizzando i legami idrogeno con i gruppi polari delle catene fosfolipidiche in questa presenti (Quinn *et al.*, 1980), rendendola in tal modo più fluida e limitando gli eventi di fusione fra le membrane, abbastanza frequenti durante la crioconservazione (Quinn e White, 1969; Maxwell e Watson, 1996).

Anche per il trealosio, come per la melatonina, sono state effettuate delle prove di congelamento per trovare una concentrazione che fosse ottimale. Partendo da delle prove

preliminari sull'ariete e da un lavoro sul muflone effettuati nel nostro laboratorio (Berlinguer *et al.*, 2006) è stato deciso di testare inizialmente il trealosio durante tutta la fase di discesa termica del seme (a partire da 27°C), addizionato all'extender base nelle concentrazioni del 25%-50%-75%-100% e non sono state evidenziate differenze statisticamente significative fra i gruppi. Si è deciso allora di provare l'associazione trealosio-melatonina addizionandoli all'extender base e utilizzando le concentrazioni che nelle prove precedenti avevano dato valori medi più alti (50% e 75% per il trealosio; 0,1 mM per la melatonina); i risultati non sono stati soddisfacenti in quanto, anche in questo caso, non sono state riscontrate differenze.

Il dato ottenuto sull'utilizzo del trealosio in refrigerazione è in disaccordo con lo studio di Eiman *et al.* (2003), ma potrebbe essere spiegato da quanto riportato da Satpathy *et al.* (2004), i quali hanno riscontrato che l'azione del trealosio dipende dalle temperature e dalla durata di esposizione e che il bilancio osmotico fra l'ambiente intracellulare e la soluzione esterna alla cellula sia fondamentale per il suo assorbimento. La capacità del trealosio di integrarsi nella membrana dipende dalla pressione osmotica che si genera nella soluzione extracellulare. E' possibile pertanto che le condizioni isosmotiche presenti in fase di refrigerazione abbiano impedito l'azione del trealosio, che invece può agire con più successo se associato ad un crioprotettore iperosmotico.

Pertanto, sulla base di alcune informazioni riportate in letteratura circa l'effetto sinergico di un crioprotettore non penetrante (in questo caso il trealosio) e uno penetrante (glicerolo) (Blanco *et al.*, 2011) si è deciso di provare ad aggiungere il trealosio in fase di congelamento (a 4°C), addizionato all'extender lecitina 1% e all'extender colesterolo 4,5 mg/ml (dopo aver effettuato delle prove per trovare le concentrazioni migliori di queste due componenti). I risultati ottenuti hanno evidenziato che il trealosio esercita un effetto positivo su alcuni parametri di qualità dello spermatozoo di becco dopo crioconservazione, quando viene addizionato al seme in fase di congelamento a 4°C (nel momento in cui il seme ha già subito

la prima fase di discesa termica da 27°C a 4°C) in associazione col glicerolo, quindi quando usato come crioprotettore. Nella prova con extender colesterolo (10° esperimento) infatti, su vitalità e rapidi, l'associazione colesterolo-trealosio 50 mM ha mostrato valori medi più alti del colesterolo-trealosio 100 mM (pur non presentando differenza significativa) ed è risultato statisticamente migliore del controllo e dell'extender base con solo trealosio. Nella prova con extender lecitina i risultati sono stati più soddisfacenti sui tre parametri: motili progressivi, rapidi e ATP. Infatti, nei primi due il gruppo lecitina-trealosio 50 mM ha dato valori medi più alti del gruppo lecitina-trealosio 100 mM (pur non presentando differenza significativa), del controllo e dell'extender base con solo trealosio. Sull'ATP il gruppo lecitina-trealosio 100 mM ha dato differenza statisticamente significativa e il valore medio più alto fra tutti i gruppi.

Il dato ottenuto può essere dovuto ad una delle caratteristiche fisico-chimiche del trealosio, la sua idrosolubilità, che rappresenta un serio ostacolo per l'attraversamento della membrana cellulare, che pertanto non è permeabile a questo zucchero (Crowe *et al.*, 1989). La presenza di trealosio nel medium di congelamento esercita un' azione osmotica dimostrata dall' incremento di osmolarità registrato in seguito alla sua aggiunta nell'extender. Il passaggio di acqua dall'interno verso l'esterno avviene in modo graduale, rendendo le membrane meno vulnerabili ai rapidi cambiamenti morfologici che si verificano durante il passaggio di stato dalla fase liquida a quella solida, tipica del processo di congelamento. Alla stabilizzazione delle membrane si aggiunge inoltre un altro effetto positivo legato alla riduzione della quantità d'acqua all'interno della cellula (Bakas *et al.*, 1991) e quindi alla limitata formazione di cristalli di ghiaccio.

Diversi studi riportano l'associazione fra zuccheri non permeabili e crioprotettori come il glicerolo (Gao *et al.*, 1997; Purdy, 2006) e da alcuni di questi è emerso che la combinazione di crioprotettori penetranti e non penetranti nell'extender di congelamento del seme risulta migliore dell'utilizzo di uno solo dei due (Blanco *et al.*, 2011). Alcuni autori hanno riportato

inoltre l'effetto combinato del trealosio e del glicerolo in un extender a base di tuorlo d'uovo (Hu *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2012), mentre altri hanno indagato sull'effetto sinergico dei due testandoli a diverse concentrazioni (Gutierrez-Perez, 2009; Storey *et al.*, 1998). Si può pertanto ipotizzare che la presenza nel medium di congelamento di un'altra molecola ad azione crioprotettiva, rappresentata dal glicerolo, possa portare ad un effetto combinato dei due crioprotettori. Il trealosio, come già detto, determinando una leggera disidratazione della cellula, sviluppa una certa forza osmotica esterna che permette al glicerolo, molecola liposolubile, di penetrare all'interno della cellula ed esercitare la sua azione crioprotettiva. Pertanto il trealosio da un lato agisce come crioprotettore sulle membrane esterne della cellula e dall'altro favorisce l'ingresso del glicerolo, che svolgerà la sua azione crioprotettiva all'interno della stessa.

In uno studio sull'effetto sinergico del trealosio e del glicerolo sulla qualità del seme di ariete congelato in un extender a base di lecitina è emerso che la combinazione di glicerolo 5% e trealosio 100 mM offre una migliore qualità del seme dopo scongelamento, rispetto ad altre associazioni provate (solo glicerolo, glicerolo 5%-trealosio 100 mM; solo glicerolo 7%; glicerolo 7%-trealosio 50 mM; glicerolo 7%-trealosio 100 mM) (Najafi *et al.*, 2013). Questi dati sono in accordo con quanto affermato in altre ricerche (Aisen *et al.*, 2002; Jafaroghli *et al.*, 2011) e con quanto riscontrato nella presente tesi, nella quale però è stato ottenuto che, per quanto riguarda la motilità progressiva e la percentuale di rapidi, l'extender che ha dato valori medi più alti è l'extender lecitina 1%-trealosio 50 mM. Inoltre in aggiunta a quanto detto nel sopraccitato articolo, in questa tesi è stato riscontrato che l'aggiunta di trealosio 100 mM all'extender lecitina 1% incrementa significativamente anche il contenuto di ATP. Quest'ultimo dato discosta rispetto a quanto riportato per le altre prove e potrebbe essere considerato a sé stante, se si prende come riferimento quanto descritto in letteratura sul becco circa la correlazione fra qualità del seme e ATP. Secondo alcuni autori infatti (Berlinguer *et*

al., 2009) le concentrazioni di ATP intracellulare prima e dopo crioconservazione non rappresentano un parametro predittivo della capacità fecondante del seme. Altri autori hanno riscontrato invece in altre specie che il consumo di ossigeno dello spermatozoo può essere correlato alla fertilità, tanto che il dosaggio dell'ATP è stato proposto come test per definire la capacità fecondante del seme di toro dopo congelamento (Garret *et al.*, 2008).

In base a quanto detto è sembrato preferibile prendere in considerazione come concentrazione migliore di trealosio la 50 mM, visti i risultati ottenuti su due parametri di qualità molto indicativi come la motilità progressiva e i rapidi (Berlinguer *et al.*, 2009). In considerazione di questi risultati è stato deciso di testare sia l'extender colesterolo-trealosio 50 mM che l'extender lecitina-trealosio 50 mM per le successive prove, per la fecondazione eterologa e per la valutazione dell'integrità del DNA tramite Comet.

Fra le altre sostanze utilizzate in questo lavoro come ipotetiche sostitute del tuorlo d'uovo è stata presa in esame la lecitina di soia. Anche in questo caso sono state eseguite prove di congelamento preliminari che avevano l'obiettivo di trovare una concentrazione migliore, che è stata poi provata anche in associazione con altre molecole (trealosio e melatonina, come sopra descritto). Prendendo come riferimento uno studio sul seme di ariete (Forouzanfar *et al.*, 2009) è stato deciso di provare nel becco le stesse concentrazioni usate da questi autori, la 1% e la 2% arrivando fino ad un massimo del 6% (4° esperimento). I risultati ottenuti anno non hanno mostrato particolari differenze fra i gruppi, anche se la lecitina 1% ha dato i valori medi più alti, per cui è stata eseguita una seconda prova ampliando il range di concentrazioni: 1%, 5%, 10; 15% e 20%. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che la lecitina 1% sul parametro vitalità, pur non presentando differenza significativa rispetto agli altri gruppi, tranne il 5% e il controllo, ha offerto i valori medi più alti. Inoltre sul parametro rapidi la concentrazione 1% ha mostrato differenza statisticamente significativa rispetto agli altri gruppi, tranne il 15%, ma ha dato i valori medi migliori ed è risultata superiore al controllo.

Questo dato è in accordo con quanto riportato da Forouzanfar *et al.* (2009), i quali hanno condotto uno studio sul seme di ariete nel quale hanno messo a confronto, in un extender a base di Tris, due concentrazioni di lecitina di soia (1%-2% wt/vol) e due di tuorlo d'uovo (20%-15% vol/vol), supplementate con glicerolo 5% e 7% e hanno trovato che la vitalità degli spermatozoi e la percentuale di cellule motili erano significativamente maggiori per le concentrazioni di lecitina 1% e tuorlo d'uovo 20% (mentre non hanno trovato differenze significative fra il glicerolo 5% e 7%).

Inoltre va precisato che concentrazioni sempre più alte di lecitina possono risultare dannose per lo spermatozoo in termini di vitalità e motilità spermatica, in quanto la riduzione dei suddetti parametri è dovuta anche alla sua alta viscosità. Questa osservazione è stata fatta anche nel presente lavoro, ma per concentrazioni molto più elevate del 15% e 20%, che hanno compromesso la viabilità degli spermatozoi post scongelamento. Van Wagendonk-de Leeuw *et al.* (2000) hanno riportato che un'alta concentrazione di lecitina aumenta la viscosità dell'extender e che la presenza di detriti al suo interno può ridurre anche la fertilità del seme. In aggiunta è stato visto che una differenza fra tuorlo d'uovo e lecitina è l'aumentata agglutinazione dopo utilizzo del tuorlo, che è stata ben documentata in letteratura da Aires *et al.* (2003).

In un altro studio condotto da Emamverdi *et al.* (2013) sono state confrontate fra loro varie concentrazioni di lecitina (0,5%-1%-1,5%-2%-2,5% wt/vol) in un extender a base di tris rispetto ad un extender al 20% di tuorlo d'uovo ed è stato riscontrato che la percentuale migliore sui parametri di motilità e di integrità dell'acrosoma era la lecitina 1,5%. Questo dato è simile a quello ottenuto in lavori precedenti sulla crioconservazione del seme di ariete (Forouzanfar *et al.* 2010) e becco (Roof *et al.* 2012). Dalle ricerche di Emamverdi *et al.* (2013) inoltre è emerso che gli spermatozoi sono in grado di nuotare più facilmente in extenders contenenti lecitina di soia piuttosto che in altri tipi di medium, a conferma del fatto

che la presenza di lecitina può migliorare i parametri di motilità spermatica.

Anche per quanto riguarda il colesterolo è stata eseguita una prova preliminare (7° esperimento) per trovare una concentrazione ottimale da usare come sostitutiva del tuorlo d'uovo, anche in associazione con altre molecole (trealosio e melatonina, come sopra descritto). E' stato scelto il colesterolo partendo dalla considerazione che il danno riportato dal bi layer fosfolipidico durante il passaggio di fase causato dalla crioconservazione è relazionata alla quantità di colesterolo nella membrana. Per cui quando quest'ultima viene sottoposta alle basse temperature l'aggiunta di colesterolo può incrementare la crio-resistenza evitando o mitigando la fase di transizione della membrana (Darin-Bennet e White, 1997). Inoltre è stato riportato che il colesterolo riveste un ruolo importante nel mantenimento della fluidità e della stabilità della membrana cellulare (Cabrata *et al.*, 2001;), ne caratterizza la morfologia e ne riduce la permeabilità limitando lo stress osmotico (Walters *et al.*, 2009). Alcuni autori gli hanno conferito anche una funzione antiossidante (Crockett, 1998).

Essendo il colesterolo una sostanza idrofobica, in questo lavoro è stato usato in associazione alle metil-beta-ciclodestrine (MBC), le ciclodestrine più usate per trattare il seme per la crioconservazione, rifacendosi a quanto riportato in letteratura. Per trattare il seme con CLC è anche importante non utilizzare tuorlo d'uovo o latte nell'extender perché le componenti in essi presenti interferiscono con il colesterolo durante la fase di trasferimento dentro gli spermatozoi (Combes *et al.*, 2000; Purdy e Graham, 2004). Alcuni autori hanno affermato che il trattamento del seme di toro con colesterolo legato alle ciclodestrine (CLC), incrementandone il contenuto nelle membrane, aumenta la resistenza degli spermatozoi dai danni da congelamento (Purdy e Graham, 2004). Alcuni lavori descrivono l'utilizzo di diverse concentrazioni di CLC, da 1 a 5 mg/ml CLC/120 x 10⁶ spermatozoi (Tomàs *et al.* 2008), mentre altri ricercatori hanno riportato nel becco concentrazioni ottimali di 2,5 mg CLC/120 x 10⁶ spermatozoi (Barrera-Compean *et al.*, 2005). Il seme di becco inoltre, per la particolari

caratteristiche del plasma seminale, necessita di una o due centrifugazioni per la rimozione dello stesso prima della diluizione con l'extender, per cui in questa specie l'aggiunta di CLC deve essere fatta sul seme privo di plasma (Tomàs *et al.*, 2008).

In uno studio condotto sugli effetti del colesterolo legato alle ciclodestrine e addizionato ad un extender con tuorlo d'uovo contenente albumina sierica bovina (2,5 %) sono state testate diverse concentrazioni di colesterolo (0,75; 1,25; 2,25 e 3 mg/ml) ed è stato ottenuto che la migliore era colesterolo 1,5 mg/ml (Amidi *et al.*, 2010). Nel presente studio si è voluto provare ad utilizzare il colesterolo MBC (legato alle metil-beta-ciclodestrine) in un extender senza tuorlo, a partire dalle stesse concentrazioni del suddetto articolo fino ad un massimo di 5,25 mg/ml, per valutare se l'addizione di colesterolo in un extender base senza tuorlo d'uovo potesse sortire effetti positivi. Dai risultati ottenuti si è deciso di scegliere la concentrazione 4,5 mg/ml in seguito ad alcune considerazioni. Sui parametri vitalità e motilità progressiva è emerso che l'extender colesterolo 4,5 mg/ml, pur non presentando differenza significativa rispetto ad alcune delle altre concentrazioni, ha mostrato i valori medi più alti fra tutti i gruppi ed è risultato significativamente migliore del controllo. Solo sul parametro rapidi non sono state riscontrate differenze fra le varie concentrazioni. Anche sul contenuto di ATP la concentrazione 4,5 mg/ml ha presentato differenza statisticamente significativa rispetto a soli due gruppi (colesterolo 0,75 e controllo) e ha riportato valori medi più alti. Questi dati sono in contrasto con quanto sostenuto da alcuni autori, i quali hanno riportato che il colesterolo non migliora i parametri di motilità, ma ha effetti positivi solo sull'integrità della membrana (Zahn *et al.*, 2002). Invece altri ricercatori, a proposito della longevità dello spermatozoo post scongelamento, hanno visto che il seme di ariete trattato con CLC prima della crioconservazione non solo presentava alti livelli di sopravvivenza rispetto al controllo, ma manteneva un'alta percentuale di spermatozoi motili dopo incubazione a 38°C per tre ore (Mocé *et al.*, 2010). Questo risulta un dato interessante considerando che il mantenimento di

alte percentuali di spermatozoi motili durante l'incubazione riflette una maggiore probabilità per la cellula di sopravvivere nel tratto genitale femminile o di essere sottoposta con successo alla capacitazione e alla fertilizzazione in vitro (Fiser et al., 1991).

Dopo aver individuato le concentrazioni migliori delle sostanze prese in esame è stata effettuata un'ultima prova mettendole a confronto fra loro e rispetto ad un extender commerciale brevettato e a un extender al 20% di tuorlo d'uovo, come previsto dallo scopo della tesi. Sono state quindi usate le concentrazioni di lecitina 1% e colesterolo 4,5 mg /ml; inoltre si è ritenuto opportuno non escludere le associazioni lecitina 1%-trealosio 50 mM e colesterolo 4,5 mg/ml-trealosio 50 mM che, pur non avendo dato significatività, avevano presentato buoni valori medi. I risultati ottenuti mostrano che, mentre sul parametro vitalità l'extender tuorlo d'uovo ha dato conferma di essere statisticamente superiore a tutti gli altri gruppi (che non hanno mostrato differenza fra loro, tranne l'extender base controllo, che è risultato il peggiore), sugli altri parametri è possibile fare ulteriori considerazioni. Infatti, per quanto riguarda la motilità progressiva si può mettere in evidenza che è stata riscontrata differenza statisticamente significativa fra i gruppi extender base, extender lecitina 1%, extender commerciale ed extender tuorlo e sebbene l'extender tuorlo sia risultato il migliore fra tutti, l'extender lecitina ha dato valori medi superiori all'extender commerciale e al controllo. Sul parametro rapidi invece si può dire che l'extender lecitina e l'extender tuorlo non hanno differito significativamente. Inoltre l'extender lecitina 1% e l'extender commerciale hanno mostrato differenza statisticamente significativa, con i valori medi migliori riportati dall'extender lecitina. Questo dato potrebbe essere spiegato nella già descritta capacità della lecitina di preservare l'integrità delle membrane, che secondo alcuni autori è in relazione diretta con la motilità spermatica (Gil *et al.*, 2003).

Per testare in vitro la capacità fecondante della lecitina di soia e del colesterolo nelle loro concentrazioni migliori (1% per la lecitina e 4,5 mg/ml per il colesterolo) e in associazione al

trealosio (lecitina 1%-trealosio 50 mM e colesterolo 4,5 mg/ml-trealosio 50 mM) è stata effettuata una prova di fertilizzazione eterologa con oociti di ovini prepuberi, nella quale i suddetti extenders sono stati messi a confronto con un extender al 20% di tuorlo d'uovo, come previsto dallo scopo della tesi e un extender commerciale, prodotto brevettato da considerare come ulteriore controllo, oltre all'extender base. Per la fecondazione è stata scelta l'alternativa degli oociti di ovino a causa della difficoltà nel reperimento di ovaie di capra, dovuta agli scarsi numeri di macellazione in mattatoio.

I risultati hanno mostrato che l'extender lecitina 1% ha presentato differenza statisticamente significativa rispetto all'extender tuorlo e all'extender commerciale e ha dato i valori più alti, seguita dall'extender lecitina 1%-trealosio 50 mM. Inoltre il controllo, l'extender tuorlo e l'extender commerciale non hanno mostrato differenza significativa fra loro.

Il dato ottenuto per cui l'extender lecitina è risultata migliore dell'extender tuorlo d'uovo potrebbe trovare spiegazione in una ipotesi secondo la quale il tuorlo danneggerebbe l'integrità dell'acrosoma dello spermatozoo. A questo proposito si può citare uno studio effettuato da Eiman *et al.* (2004), nel quale il seme di becco è stato refrigerato in un extender contenente tuorlo d'uovo 20%, poi lavato e in seguito congelato in differenti medium: extenders con diverse concentrazioni di lecitina e un extender con tuorlo d'uovo. I risultati ottenuti da questi autori hanno confermato che il tuorlo offre alte percentuali sui parametri di motilità, ma riduce significativamente l'integrità dell'acrosoma rispetto ai gruppi congelati con lecitina. Il tuorlo potrebbe inoltre indurre la capacitazione e la reazione acrosomiale.

Nello stesso lavoro si è voluta valutare l'interazione fra tuorlo d'uovo e glicerolo congelando il seme in un extender contenente la combinazione tuorlo-glicerolo oppure solo tuorlo o solo glicerolo ed è stato visto che l'accoppiamento delle due componenti riduce la percentuale di acrosomi intatti. In aggiunta l'incubazione degli spermatozoi in un diluente

contenente tuorlo d'uovo e glicerolo prima del congelamento potrebbe incrementare il numero di spermatozoi che subiscono la reazione acrosomiale, risultando in un abbassamento del numero di acrosomi integri dopo scongelamento.

Per quanto riguarda la lecitina invece nello studio di Emamverdi *et al.* (2013) è risultato che la percentuale di spermatozoi con acrosoma intatto negli extenders con lecitina dell'1%, 1,5% e 2% era significativamente più alta che nella lecitina 2,5% e nell'extender tuorlo. Per cui a differenza del tuorlo la lecitina, a concentrazioni fra l'1% e il 2%, eserciterebbe un'azione positiva nel mantenimento dell'integrità dell'acrosoma. Questo dato è in accordo con quanto riscontrato da Aboagla e Terada (2004) i quali hanno riportato che extenders senza tuorlo avevano un'alta percentuale di spermatozoi con acrosoma intatto rispetto a quelli congelati con tuorlo.

Inoltre sempre nel sopraccitato lavoro (Emamverdi *et al.*, 2013) è risultato che la concentrazione di lecitina 1,5% ha permesso la sopravvivenza di una maggiore percentuale di spermatozoi con integrità funzionale della membrana rispetto alle altre concentrazioni e all'extender con tuorlo. Questo è un dato interessante se si considera che l'integrità della membrana plasmatica è necessaria per il mantenimento della funzionalità degli spermatozoi durante il loro passaggio nel tratto genitale femminile; pertanto lesioni in essa presenti, causati da dissesti dei lipidi di membrana durante la crioconservazione, possono indurre ulteriori danni e di conseguenza portare alla morte cellulare (Holt e North, 1984, 1994).

Sui gruppi sottoposti alla prova di fertilizzazione (11° esperimento) è stata eseguita anche la valutazione dello stato di integrità del DNA tramite metodica Comet assay, per mettere in evidenza le eventuali differenze fra i diversi extenders di congelamento utilizzati e verificare se potevano influenzare questo parametro.

La cellula spermatica dopo spermiogenesi non possiede più la capacità di riparare possibili danni al suo DNA insorti durante il suo passaggio nell'epididimo, dopo

l'eiaculazione o a seguito delle procedure di crioconservazione. In particolare pare che il congelamento danneggi la cromatina (Hammadeh *et al.* 1999; Donnelly *et al.* , 2001).

Come è noto dopo crioconservazione gli spermatozoi sono suscettibili a danni del loro DNA poiché il processo di congelamento e scongelamento porta a significative riduzioni dei livelli di antiossidanti (Bilodeau *et al.*, 2003), per cui l'integrità del DNA rappresenta un importante parametro di valutazione della qualità del seme. Inoltre il grado di frammentazione o di integrità del DNA dello spermatozoo è strettamente correlato al normale sviluppo dell'embrione nei primi stadi, sia in vivo che in vitro.

Dai risultati ottenuti si può affermare che per quanto riguarda l'area della cometa gli extenders con lecitina, colesterolo e tuorlo sono risultati paragonabili fra loro; mentre sulla percentuale di DNA nella coda, che rappresenta il parametro più significativo, sebbene ci sia stata una certa omogeneità fra i gruppi, l'extender colesterolo sembra aver dato i risultati migliori. Questo dato potrebbe essere attribuibile alla sua già descritta azione stabilizzante le membrane cellulari, che si rifletterebbe in una maggiore protezione dello spermatozoo e quindi anche del suo DNA dagli insulti generati dalla crioconservazione.

In alcuni studi è stato visto che spermatozoi con severi danni al DNA non hanno presentato alterazioni funzionali agli organelli intracellulari e non hanno mostrato riduzioni dei parametri di motilità (Bordignon e Smith, 1999). Inoltre non esiste un rapporto diretto fra percentuali di fecondazione e danno al DNA degli spermatozoi, dal momento che quest'ultimo non inficia la loro capacità fecondante, ma causa problemi negli stadi successivi dello sviluppo embrionale, quando il genoma paterno esercita la sua maggiore influenza (Tesarik *et al.*, 2004).

In queste considerazioni trova conferma quanto ottenuto nel presente lavoro sulla prova di fecondazione, che essendo stata una fecondazione eterologa aveva come obiettivo esclusivamente la valutazione della capacità fecondante, nella quale il seme diluito con

entender a base di lecitina di soia ha dato percentuali significativamente superiori a tutti gli altri.

In questa tesi è stato effettuato anche il dosaggio della capacità antiossidante totale, dei tioli totali e del glutatione sull'estratto cellulare del seme scongelato, trattato in fase di congelamento con i diversi extender utilizzati nelle varie prove. E' stato ritenuto utile eseguire questi dosaggi in quanto gli spermatozoi sono altamente suscettibili allo stress ossidativo che può insorgere durante il processo di crioconservazione (Stradaioli *et al.*, 2007).

Nella prova lecitina-trealosio a 4°C (9° esperimento) è stato riscontrato che la lecitina 1%, con e senza trealosio (50 mM), ha mostrato concentrazioni di GSH significativamente più elevate rispetto all'extender controllo e questo è riconducibile con quanto ottenuto per la stessa prova sulla motilità progressiva e sui rapidi. Questo dato non è trascurabile essendo il glutatione un essenziale antiossidante intracellulare e in considerazione del fatto che la crioconservazione determina una riduzione dei suoi livelli. In letteratura non ci sono informazioni circa la relazione fra lecitina nell'extender di congelamento e le concentrazioni di GSH nel seme. Alcuni autori hanno riportato che l'aggiunta del GSH al seme di toro riduce la lipoperossidazione, è ciò si riflette in un incremento della vitalità (Ansari *et al.*, 2012) e della motilità oltre che sull'integrità della membrana (Ansari *et al.*, 2011; Ansari *et al.*, 2012). Inoltre l'aumento di vitalità spermatica è risultato dose dipendente alla concentrazione di GSH aggiunto all'extender (Ansari *et al.*, 2012) nel bufalo e questo risultato è coerente con quanto trovato precedentemente da altri autori per la specie caprina (Sinha *et al.*, 1996) e bovina (Perumal *et al.*, 2011).

Vale la pena precisare che un aumento della vitalità e della motilità è risultato correlato alla fertilità in vitro nel toro (Tartaglione *et al.*, 2004) e che nel presente lavoro l'extender lecitina 1%, oltre ad aver mostrato risultati soddisfacenti in termini di motilità e più alte concentrazioni intracellulari di GSH, ha presentato percentuali di fertilizzazione in vitro

significativamente superiori rispetto agli altri gruppi e, poiché la fertilizzazione in vitro rappresenta il parametro d'elezione per valutare la capacità fecondante del seme, questo dato non può essere sottovalutato.

Inoltre per quanto riguarda la capacità antiossidante totale, la lecitina 1% associata a trealosio 50 mM ha mostrato i valori medi più alti rispetto agli altri gruppi (11° esperimento) e l'extender lecitina 1% non ha presentato differenze significative rispetto all'extender commerciale e all'extender tuorlo. Nello stesso esperimento è stato osservato inoltre che il gruppo lecitina 1% ha presentato valori medi di motilità progressiva significativamente superiori rispetto all'extender controllo e all'extender commerciale. Si potrebbe ipotizzare che l'azione positiva della lecitina sul mantenimento dell'equilibrio redox all'interno degli spermatozoi, che si è mantenuto sui valori medi riscontrati anche per l'extender tuorlo e l'extender commerciale, possa essersi riflesso anche sui parametri di motilità e di fertilizzazione, grazie anche all'azione protettiva della lecitina sul mantenimento dell'integrità di membrana.

16. CONCLUSIONI

In questo lavoro, che si colloca in un più ampio programma di ricerca sui processi riproduttivi di diverse specie domestiche, si è cercato di mettere a punto un sistema definito per la crioconservazione del seme di becco di razza sarda, tramite l'utilizzo di sostanze che potessero essere sostitutive al tuorlo d'uovo nell'extender di congelamento. Ne sono state prese in considerazione quattro: il trealosio come crioprotettore, la melatonina come antiossidante, il colesterolo per la sua azione stabilizzante le membrane cellulari e la lecitina di soia come fonte di lipoproteine naturali.

Di queste sostanze sono state ricercate le concentrazioni ottimali in un extender base e una volta identificate, sono state provate un associazione fra loro. Infine i gruppi che hanno dato i migliori risultati sono stati messi a confronto fra loro e con un extender commerciale e uno contenente tuorlo d'uovo, come previsto dallo scopo della tesi.

Sia prima che dopo il congelamento sono stati presi in considerazione come parametri di qualità la vitalità; la percentuale di spermatozoi motili progressivi e rapidi, tramite analisi computer CASA; il contenuto intracellulare di ATP; il dosaggio della capacità antiossidante totale, dei tioli totali e del glutatione; il gradi di frammentazione del DNA, tramite metodica Comet assay. Inoltre è stata eseguita una prova di fertilizzazione eterologa come test d'elezione per la valutazione della capacità fecondante.

Fra le molecole testate la melatonina si è mostrata efficace come antiossidante solo alla concentrazione più alta fra quelle testate, ma questo non si è riflesso sui parametri di motilità, anzi è possibile che alle concentrazioni utilizzate in questo lavoro la melatonina nel becco possa comportarsi come proossidante. Per questo motivo sarebbe interessante testare altre concentrazioni per questa specie.

Il trealosio ha mostrato il suo effetto crioprotettivo alla concentrazione di 50 mM quando usato come crioprotettore a 4°C in associazione col glicerolo, probabilmente grazie all'azione

sinergica di queste due molecole con diverso meccanismo d'azione.

Il colesterolo, alla concentrazione 4,5 mg/ml ha mostrato i migliori risultati, sia da solo che in associazione al trealosio 50 mM, sui parametri di vitalità e motilità, probabilmente in virtù della sua azione protettiva sulla membrana spermatica.

La lecitina, alla concentrazione dell'1%, ha presentato i più alti valori sui parametri di motilità, sia da sola che in associazione al trealosio 50 mM, sulla vitalità, sulla motilità progressiva e la percentuale di rapidi. Inoltre nella prova di fertilizzazione eterologa la lecitina 1%, ha presentato la più alta percentuale di divisi fra gli oociti sottoposti a fecondazione, con valori medi significativamente più alti rispetto a tutti gli altri gruppi messi a confronto.

Pertanto la lecitina 1% può essere usata come sostitutiva del tuorlo d'uovo nell'extender di congelamento per il seme di becco di razza sarda.

In conclusione le prove eseguite in questo lavoro hanno permesso l'acquisizione di notizie teoriche e pratiche da poter sfruttare nell'ambito delle tecnologie riproduttive nella capra sarda che rappresenta una specie di nicchia per la realtà economica e l'allevamento della Sardegna.

17. BIBLIOGRAFIA

Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA. Studies on the presence and absence of glycerol in unfrozen and frozen semen: fertility trials and the effect of dilution methods on freezing ram semen in the absence of glycerol. *Cryobiology* **1991**, 28, 36–42.

Abdelhakeam AA, Graham EF, Vazquez IA, Chaloner KM. Studies on the absence of glycerol in unfrozen and frozen ram semen. *Cryobiology* **1991**, 28, 43–49.

Aboagla EM, Terada T. Trehalose enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* **2003**, 69, 1245–1250.

Aboagla EM, Terada T. Effects of egg yolk during the freezing step of cryo- preservation on the viability of goat sper- matozoa. *Theriogenology* **2004**, 62, 1160–1172.

Aboagla EM, Terada T. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoo. *Theriogenology* **2004**, 62, 809–818.

Acuna-Castroviejo D, Escames G, Carazo A, León J, Khaldy H, Reiter RJ. Melatonin, mitochondrial homeostasis and mitochondrial-related diseases. *Curr. Top Med. Chem.* **2002**, 2, 133–151.

Aires VA, Hinsch KD, Mueller-Schloesser F, Bogner K, Mueller- Schloesser S, Hinsch E. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreserva- tion of bovine semen. *Theriogenology* **2003**, 60, 269–79.

Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* **2000**, 53, 1053–1061.

Aisen E, Medina V, Venturino A. Cryopreservation and post thawed fertility of ram semen

- frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* **2002**, *57*,1801–1808.
- Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.* **1995**, *7*, 659–668.
- Almeida J, Ball BA. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* **2005**, *87*, 321–337.
- Alvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effect on sperm motility. *Biol. Reprod.* **1982**, *27*, 1102–1108.
- Alvarez JG, Storey BT. Evidence of increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J. Androl.* **1992**, *13*, 232–241.
- Alvarez JG, Storey BT. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biol. Reprod.* **1984**, *30*, 323–331.
- Amann RP. Cryopreservation of sperm. In: Knobil E, Neill JD (eds). *Encyclopedia of reproduction*. Academic Press, Burlington, MA, **1999**, 773–783
- Amann RP, Pickett B. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Sci.* **1987**, *7*, 145–173.
- Amidi F, Farshad A, Khor AK. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrine during freezing step of cryopreservation with TCGY extender containing bovine serum albumin on quality of goat spermatozoa. *Cryobiology* **2010**, *61*, 94-99.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a

commercial egg yolk extender. *Theriogenology* **2004**, *61*, 895–907.

Andrabi SMH, Ansari MS, Ullah N, Afzal M. Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus Bubalis*) bull spermatozoa. *Pakistan Vet. J.* **2008**, *28*, 159-162.

Andrabi S, Maxwell W. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *99*, 223–243.

Anel L, De Paz P, Alvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, González M, Kaabi M, Anel E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology* **2003**, *60*, 1293–1308.

Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SM, Ullah N, Iqbal R, Holt WV, Akhter S. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. *Reprod. Biol.* **2012**, *12*, 271–276.

Arav A. Device and methods for multigradients directional cooling and warming of biological samples. *US Patent* **1999**, *5*, 873:254.

Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel Y, Gacitua H. New trends in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2002**, *187*, 77–81.

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

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

Balestri F, Giannecchini M, Sgarrella F, Carta MC, Tozzi MG, Camici M. Purine and pyrimidine nucleosides preserve human astrocytoma cell adenylate energy charge under ischemic conditions. *Neurochem. Int.* **2007**, *50*, 517–523.

Bakás LS, Disalvo EA. Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology* **1991**, *28*, 347–353
Ball BA, Vo AT, Baumber J. Reactive oxygen species generation by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* **2001**, *62*, 5508–5515.

Barbas JP, Mascarenhas RD. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell. Tissue Bank* **2009**, *10*, 49–62.

Barrera-Compean MH, Purdy PH, Dzakuma JM, Newton GR, Nuti LC. Cholesterol-loaded cyclodextrin improves post-thaw goat sperm motility. In: ADSA-ASAS- CSAS (eds), ADSA-ASAS-CSAS 2005 Joint Annual Meeting, Cincinnati, OH, USA. *J. Anim. Sci.* **2005**, *83 (Suppl. 1)*, 153, T91.

Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive Oxygen Species and Cryopreservation Promote DNA Fragmentation in Equine Spermatozoa. *J. Androl.* **2003**, *24*, 621–628.

Baumber J, Vo A, Sauber K, Ball BA. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. *Theriogenology* **2002**, *57*, 1025–1033.

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

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

Langlois ML, Barrière P, Larrat M, Tainturier D. The advantages of combining low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reprod. Domest. Anim.*

2010, 45, 189–200.

Bergmeyer HU. Standardization of enzyme assays. *Clin. Chem.* **1972**, 18, 1305–1311.

Berlinguer F, Ledda S, Rosati I, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S. Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* **2003**, 15, 19–25.

Berlinguer F, Leoni GG, Succu S, Mossa F, Galioto M, Madeddu M, Naitana S. Cryopreservation of European Mouflon (*Ovis Gmelini Musimon*) semen during the non-breeding season is enhanced by the use of trehalose. *Reprod. Domest. Anim.* **2007**, 42, 202–207.

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

Bernstein, AD, Petropavlovsky VV. Effect of non-electrolytes on viability of spermatozoa. *Bjull. Eksp. Biol. Med.* **1937**, 3, 41–43.

Berra B, Rizzo AM. Melatonin: circadian rhythm regulator, chronobiotic, antioxidant and beyond. *Clin. Dermatol.* 2009, 27, 202–209.

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

Blackshaw AW, Emmens CW. Survival of deep-frozen mammalian spermatozoa. *Vet. Rec.*

1953, 65, 872.

Blanco JM, Long JA, Gee G, Wildt DE, Donoghue AM. Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* **2011**, 123, 242–248.

Bordignon V, Smith LC. Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.* **1999**, 61, 1513–1520.

Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology* **1998**, 50, 699–706.

Breining E, Beorlegui NB, O’Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* **2005**, 63, 2126–2135.

Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP. Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, 62, 265–275.

Cabrita E, Anel L, Herraéz MP. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. *Theoriogenoloy* **2001**, 56, 623-635.

Casao A, Vega S, Palacin I, Pérez-Pe R, Laviña A, Quintín FJ, Sevilla E, Abecia JA, Cebrián-Pérez JA, Forcada F, Muiño-Blanco T. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reprod.*

Domest. Anim. **2010**, *5*, 425–432.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction* **2001**, *121*, 395–401.

Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol. Reprod. Dev.* **2001**, *59*, 451–458.

Chang MC, Walton A. The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proc. R. Soc. B* **1940**, *129*, 517–527.

Chalah T, Brillard JP. Comparison of assessment of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14/PI). *Theriogenology* **1998**, *50*, 487–493.

Chang MC, Walton A. The effects of low temperature and acclimatization on the respiratory activity and survival of ram spermatozoa. *Proc. R. Soc. B* **1940**, *129*, 517–527.

Chatterjee S, de Lamirande E, Gagnon C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.* **2001**, *60*, 498–506.

Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J. Lipid. Res.* **1997**, *38*, 2264–2272.

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

, Morros A, Membrane fluidity changes in goat sperm induced by cholesterol depletion using beta-cyclodextrin. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 2246–2255.

Colas G. Effect of initial freezing temperature, addition of glycerol and dilution on the survival and fertilizing ability of deep-frozen ram semen. *J. Reprod. Fertil.* **1975**, *42*, 277–285.

Colas G, Brice G. Seasonal variations of the fertilizing capacity of deep-frozen ram semen. In: *Proceedings of the Eighth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*, vol. 4. Crakow, Poland, **1976**, 977–998.

Colas G, Brice G. Etude des principaux facteurs de survie et de fecondance du sperme de belier après congélation. *Ceres* **1975**, *2*, 253–260.

Colas G, Dautzier I, Courot M, Ortavant R, Signoret JP. Résultats obtenus au cours de l'étude de quelques facteurs importants de l'insemination artificielle ovine. *Ann. Zootech. Paris.* **1968**, *16*, 47–57.

Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* **2004**, *26*, 249-261.

Combes GB, Varner DD, Schroeder F, Burghardt RC, Blanchard TL. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* **2000**, *56*, 127–132.

Crockett EL. Cholesterol function in plasma membranes from ectotherms: membrane-specific roles in adaptation to temperature. *Am. Zool.* **1998**, *38*, 291–304.

Cross NL. Role of cholesterol in sperm capacitation. *Biol. Reprod.* **1998**, *59*, 7–11.

Crowe J, Carpenter J, Crowe L, Anchordoguy TJ. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. In:

Symposium on Cryosensitizing and Cryoprotective Agents at the 26th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Charleston, South Carolina, **1989**.

Crowe L, Crowe J. Stabilization of dry liposomes by carbohydrates. *Dev. Biol. Stand.* **1992**, *74*, 285–294.

D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim. Reprod. Sci.* **2003**, *79*, 93–100.

Darin-Bennett A, White IG. Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology* **1977**, *14*, 466–470.

Dauzier L. Quelques résultats sur l'insémination artificielle des brebis et des chèvres en France. In: *Proc. 3rd Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Cambridge*, **1956**, *3*, 12–14

De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.* **1992**, *13*, 5

De Vasconcelos AB, De Souza PC, Varago FC, De Albuquerque Lagares M, Santoro MM. Determination of optimal glucose concentration for microcalorimetric metabolic evaluation of equine spermatozoa. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2009**, *52*, 1131–1136.

Del Valle I, Gomez-Duran A, Holt WV, Muino-Blanco T, Cebrian-Perez JA. Soy lecithin interferes with mitochondrial function in frozen-thawed ram spermatozoa. *J. Androl.* **2012**, *33*, 717–725.

De Paz P, Estes MC, Alvarez M, Mata M, Chamorro CA, Anel L. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. *Theriogenology* **2010**, *74*,

663–671.

De Meyer F, Smit B. Effect of cholesterol on the structure of a phospholipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 3654–3658.

D’Occhio MJ, Hengstberger KJ, Johnston SD. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim. Reprod. Sci.* **2007**, *101*, 1–17.

Donnelly ET, McClure N, Lewis SE. Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil. Steril.* **2001**, *76*, 892-900.

Dobziuk H. Molecules with holes–cyclodextrins. In: *Dodziuk H (ed.). Cyclodextrins and their complexes. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, Germany, 2006*, 1–30.

Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J. Exp. Zool.* **1993**, *265*, 432–437.

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

Eiman ME, Aboagla TT. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology* **2004**, *62*, 1160–1172.

Elman GL. Tissue, Sulfhydryl Groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **1959**, *82*, 70–77.

Emamverdi M, Zhandi M, Shahneh A, Sharafi M, Akbari-Sharif A. Optimization of ram semen cryopreservation using a chemically defined soybean lecithin-based extender. *Reprod. Domest. Anim.* **2013**, *48*, 899–904.

Evans G, Maxwell WM. Salamon's Artificial Insemination of Sheep and Goats. *Sydney: Butterworths*, **1987**, 194.

Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell. Sci.* **2000**, *22*, 169–189.

Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Clausen OP Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.* **1999**, *14*, 1039–1049.

Fahy GM. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* **1986**, *23*, 1–13.

Feredean T, Barbulescu I, Popovici . Studies on improvement of media for dilution of ram spermatozoa. *Lucr. Stiint. Inst. Cercet. Zootech. Bucharest*, **1967**, *25*, 459–469.

Fischer T. Computerized videomicrography applied to deep-frozen ram semen, with reference to osmolarity of the diluent and morphology of the spermatozoal head cap. *Inaugural-Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin. A.B.A.* **1990**, 3712.

Fiser PS, Ainsworth L, Fairfull W. Evaluation of a new diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* **1987**, *28*, 599–607.

Fiser PS, Fairfull RW. Effects of changes in photoperiod on freezability of ram spermatozoa. *Cryobiology* **1983**, *20*, 684–689.

Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* **1984**, *21*, 542–551.

Fiser PS, Fairfull RW. The effects of rapid cooling, cold shock of ram semen, photoperiod, and egg yolk in diluents on the survival of spermatozoa before and after freezing. *Cryobiology* **1986**, *23*, 518–524.

Fiser PS, Hansen C, Underhill H, Marcus GJ. New thermal stress test to assess the viability of cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* **1991**, *28*, 454–459.

Fujinoki M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* **2008**, *136*, 533–541.

Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J. Reprod. Dev.* **2008**, *54*, 286–289.

Forouzanfar M, Sharafi M, Hosseini SM, Ostadhosseini S, Hajian M, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Nasr- Esfahani MH. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology* **2010**, *73*, 480–487.

Fraser L, Strzezek J. Effects of freezing-thawing on DNA integrity of boar spermatozoa assessed by the neutral comet assay. *Reprod. Domest. Anim.* **2005**, *40*, 530–536.

Fujinoki M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction* **2008**, *136*, 533–541.

Galantino-Homer HL, Zeng WX, Megee SO, Dallmeyer M, Voelkl D, Dobrinski I. Effects of 2-hydroxypropyl- beta-cyclodextrin and cholesterol on porcine sperm viability and capacitation status following cold shock or incubation. *Mol. Reprod. Dev.* **2006**, *73*, 638–650.

Gao DY, Liu J, Lui C, McGann LE, Watson PF, Kleinhans FW, Mazur P, Critser ES, Critser

JK. Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum. Reprod.* **1995**, *10*, 1109–1122.

Gao DY, Mazur P, Critser JK. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: Karow AM, Critser JK (eds). Reproductive tissue banking. Academic press, San Diego **1997**, 263–328.

Gandini L, Lombardo F, Lenzi A, Spano M, Dondero F. Cryopreservation and sperm DNA integrity. *Cell. Tissue Bank* **2006**, *7*, 91–98

Garrett LJ, Revell SG, Leese HJ. Adenosine triphosphate production by bovine spermatozoa and its relationship to semen fertilizing ability. *J. Androl.* **2008**, *29*, 449–458.

Gilmore JA, Liu J, Peter AT, Critser JK. Determination of plasma membrane characteristics of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *Biol. Reprod.* **1998**, *58*, 28–36.

Gil J, Lundeheim N, Rodriguez-Iraozqui M, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell and used for artificial insemination. *Theriogenology* **2003**, *59*, 1157–1170.

Gil J, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of extender, temperature, and addition of glycerol on post-thaw sperm parameters in ram semen. *Theriogenology* **2003**, *59*, 1241–1255.

Gillan L, Maxwell WM. The functional integrity and fate of cryopreserved ram spermatozoa in the female tract. *J. Reprod. Fertil.* **1999**, *Suppl 54*, 271–283.

Glazar AI, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL, Graham JK. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated

with cholesterol. *Cryobiology* **2009**, *59*, 201–206.

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

Graham EF, Crabo BG, Pace MM,. Current status of semen preservation in the ram, boar and stallion. *J. Anim. Sci.* **1978**, *47 Suppl. 2*, 80–119.

Graham JK, Foote RH. Effect of several lipids fatty acyl chain length and degree of insaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. *Cryobiology* **1987**, *24*, 42–52.

Guérin, Y., Cognié, Y., Poulin, N. Freezability of freshly ejaculated and frozen ram semen in vitro. In: *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, vol. 3. The Hague, The Netherlands, 1992*, 1418–1420.

Guthrie HD, Liu J, Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2002**, *67*, 1811–1816.

Gutierrez-Perez O, Juarez-Mosqueda Mde L, Carvajal SU, Ortega M.E. Boar spermatozoa cryopreservation in low glycerol/trehalose enriched freezing media improves cellular integrity. *Cryobiology* **2009**, *58*, 287–292.

Gwayi N, Bernard RT. The effects of melatonin on sperm motility in vitro in Wistar rats. *Andrologia* **2002**, *34*, 391–396.

Hammadeh ME, Askari AS, Georg T, Rosenbaum P, Schmidt W. Effect of freeze-thawing procedure on chromatin stability, morphological alteration and membrane integrity of human

spermatozoa in fertile and subfertile men. *Int. J. Androl.* **1999**, *22*, 155-162.

Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* **1990**, *11*, 73–88.

Hammerstedt RH. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation system. *Reprod. Fertil. Dev.* **1993**, *5*, 675– 690.

Holt WV, North RD. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze fracture study. *J. Exp. Zool.* **1984**, *230*, 473–483.

Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* **1994**, *51*, 414–424.

Hunter RHF, Hall JP. Capacitation of boar spermatozoa: synergism between uterine and tubal environments. *J. Exp. Zool.* **1974**, *188*, 203–214

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

Hafez ESE. Studies on the breeding season and reproduction in the ewe. *J. Agr. Sci.* **1952**, *42*, 189–265.

Hardeland R, Tan DX, Reiter RJ. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. *J. Pineal Res.* **2009**, *47*, 109–

Holt C, Holt WV, Moore HD, Reed HC, Curnock RM. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. *J. Androl.* **1997**, *18*, 312–323.

Holt WV, North RD. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze fracture study. *J. Exp. Zoo.* **1984**, *1* 230, 473–483.

Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* **1994**, *51*, 414–424.

Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Yang H, Zhang SS, Zhao HW. The cryoprotective effect of trehalose supplementation on boar spermatozoa quality. *Reprod. Domest. Anim.* **2009**, *44*, 571–575.

Isachenko E. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod. Biomed. Online* **2003**, *6*, 191–200.

Ishizuka B, Kuribayashi Y, Mural K, Amemiya A, Ithoh MT. The effect of melatonin on in vitro fertilization and embryo development in mice. *J. Pineal Res.* **2000**, *28*, 48–51.

Ivanov II. De la fécondation artificielle chez les mammifères. *Arch. Sci. Bio. Inst. Imp. Méd. Exp., St. Pétersbourg* **1907**, *12*, 377–511.

Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H. Sulfur and selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 4742–4758.

- Jafaroghli M, Khalili B, Farshad A, Zamiri M. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. *Small Rumin. Res.* **2011**, *96*, 58–63.
- Jeyendran RS, Acosta VC, Land S, Coulam CB. Cryopreservation of human sperm in a lecithin-supplemented freezing medium. *Fertil. Steril.* **2008**, *90*, 1263–1265.
- Kampschmidt R, Mayer DT, Herman HA. Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in the resistance and storage of bull spermatozoa. *J. Dairy Sci.* **1953**, *36*, 733–742.
- Khalifa TAA, Waheed MM. An endeavor to improve longevity of cryopreserved equine sperm. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* **2006**, *1*, 91–95.
- Kong D, Shang H, Guo K, Liu Y, Zhang J, Wei H. A study on optimizing the cryopreservation methods for bama miniature pig semen. *Exp. Anim.* **2012**, *61*, 533–542.
- Kundu CN, Chakraborty J, Dutta P, Bhattacharyya D, Ghosh A, Majumder GC. Effects of dextrans on cryo- preservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. *Reproduction* **2002**, *123*, 907–913.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran: Le basi patologiche delle malattie “Elsevier Italia” Milano, 7°edizione, **2006**, 14-19.
- Laothong U, Pinlaor P, Hiraku Y, Boonsiri P, Prakobwong S, Khoontawad J, Pinlaor S. Protective effect of melatonin against *Opisthorchis viverrini*-induced oxidative and nitrosative DNA damage and liver injury in hamsters. *J. Pineal Res.* **2010**, *49*, 271–282.
- Lardy HA, Phillips H. Preservation of spermatozoa. In: *Proc. Am. Soc. Anim. Prod. 32nd Ann. Meet.* **1939**, 219–221.

Larson-Cook KL, Brannian JD, Hansen KA, Kasperson KM, Aarnold ET, Evenson DP. Relationship between the outcomes of assisted reproductive techniques and sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin structure assay. *Fertil. Steril.* **2003**, *80*, 895–902.

Leòn J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res.* **2005**, *38*, 1–9.

Li G, Saenz J, Godke RA, Devireddy RV. Effect of glycerol and cholesterol-loaded cyclodextrin on freezing- induced water loss in bovine spermatozoa. *Reproduction* **2006**, *131*, 875–886.

Lightfoot RJ, Salamon S. Freezing of ram semen by the pellet method. II. The effect of method of dilution, dilution rate, glycerol concentration, and duration of storage at 58 °C prior to freezing on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* **1969**, *22*, 1547–1560.

Lightfoot RJ, Salamon S. Freezing of ram semen by the pellet method. III. The effect of pellet volume, composition of the thawing solution, and reconcentration of the thawed semen on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* **1969**, *22*, 1561–1572.

Lòpez A, García JA, Escames G, Venegas C, Ortiz F, Lòpez LC, Acuña-Castroviejo D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. *J. Pineal Res.* **2009**, *46*, 188–198.

Lopyrin AI. Biology of Reproduction in Sheep. *Kolos, Moscow*, **1971**, 320.

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

- Madeddu M, Berlinguer F, Pasciu V, Succu S, Satta V, Leoni GG, Zinellu A, Muzzeddu M, Carru C, Naitana S. Differences in semen freezability and intracellular ATP content between the rooster (*Gallus gallus domesticus*) and the Barbary partridge (*Alectoris barbara*). *Theriogenology* **2010**, *74*, 1010–1018.
- Marinov P, Zlatarev ST, Grudova ChN. Semen diluents for freezing ram spermatozoa. *Cryobiology of Reproductive Cells. Bulgarian Academy of Science, Sofia*, **1983**, 86–101.
- Martin M, Macias M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J.* **2000**, *14*, 1677–1679.
- Martin WG, Augustyniak J, Cook WH.. Fractionation and Characterization of the Low-Density Lipoproteins of Hen's Egg Yolk. *Biochim. Biophys. Acta* **1964**, *84*, 714–720.
- Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* **1984**, *247*, C125–C142.
- Mazur P. Basic concepts in freezing cells. In: Johnson LA, Larsson K Ž (eds). *Deep Freezing of Boar Semen. Proc. 1st Int. Conf. Deep Freez. Boar Semen Swedish Univ. Agr. Sciences, Uppsala*, **1985**, 91–111.
- Maxwell WM, Landers AJ, Evans G. Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology* **1995**, *43*, 1201–1210.
- Maxwell WM, Salamon S. Liquid storage of ram semen: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* **1993**, *5*, 613–638.
- Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim.*

Reprod. Sci. **1996**, *42*, 55–65.

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

Medeiros CM, Forell F, Oliveira AT, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. *Theriogenology* **2002**, *57*, 327–344.

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

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

Milani C, Fontbonne A, Sellem E, Stelletta C, Gérard O, Romagnoli S. Effect of post-thaw dilution with caffeine, pentoxifylline, 2'-deoxyadenosine and prostatic fluid on motility of frozen-thawed dog semen. *Theriogenology* **2010**, *74*, 153–164.

Milovanov VK. The present state of storage and transport of semen of farm animals. *Trudy Lab. Iskusst. Osem. Zivotn., Moscow* **1940**, *1*, 85–107.

Milovanov VK. Methods of storage of semen of ruminants. *News in the Biology of Reproduction of Farm Animals. Seljhozgiz, Moscow*, **1951**, 139–165.

Milovanov VK. *Biology of Reproduction and Artificial Insemination of Animals. Seljhozizdat, Moscow*, **1962**, 696.

Milovanov VK, Sokolovskaja II. Long-term storage of ram semen and new possibilities of large-scale selection in sheep breeding. *Vestn. Skh. Nauki* **1980**, *12*, 122–132.

- Milovanov VK, Varnavskaja VA, Shajdullin, I.N., Medium for deep freezing of semen. *Zhivotnovodstvo* **1985**, 7, 39–41.
- Miki K. Energy metabolism and sperm function. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* **2007**, 65, 309–325.
- Mocé E, Purdy PH, Graham JK. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, 118, 236–247.
- Molinia FC, Evans G, Quintana Casares, PI, Maxwell W.C. Effect of monosaccharides and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **1994**, 36, 113–122.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* **2005**, 51, 241–249.
- Moussa M, Marinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M, Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* **2002**, 57, 1695–1706.
- Movassaghi S, Saki G, Javadnia F, Panahi M, Mahmoudi M, Rhim F, Effects of methyl-beta-cyclodextrin and cholesterol on cryosurvival of spermatozoa from C57BL/6 mouse. *Pak J. Biol. Sci.* **2009**, 12, 19–25.
- Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2008**, 78, 390–399.
- Nagase H, Graham EF. Pelleted semen: comparison of different extenders and processes on

fertility of bovine spermatozoa. *Proc. 5th Int. Congr. Anim. Reprod. A.I., Trento, 1964, 4*, 387–389.

Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, Sharif AA, Motlagh MK, Martinez-Pastor F. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. *Cryobiology* **2013**, *66*, 275–282.

Navratil AM, Bliss SP, Berghorn KA, Haughian JM, Farmerie TA, Graham JK, Clay CM, Roberson MS. Constitutive localization of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor to low density membrane microdomains is necessary for GnRH signaling to ERK. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 31593–31602.

Nauk VA. Structure and Function of Spermatozoa of Farm Animals During Cryopreservation. *Stiinta, Kishinev, Moldavia, 1991*, 199.

Nauk VA, Lansberg ES, Sherikin VN. Cryogenic changes in ram spermatozoa. *Ovtsevodstvo* **1970**, *10*, 25–27.

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

Ollero M, Muino-Blanco T, Lopez-Perez MJ, Cebrian-Perez JA. Surface changes associated with ram sperm cryopreservation revealed by counter-current distribution in an aqueous two-phase system: effect of different cryoprotectants. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1996**, *680*, 157–164.

Oliveira CH, Vasconcelos AB, Souza FA, Martins-Filho OA, Silva MX, Varago FC, Lagares MA. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *118*, 194–200.

Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Macías García B, Salazar-Sandoval C, Morillo Rodríguez A, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Peña FJ. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.* **2009**, *81*, 1106–1111.

Pace MM, Graham EF. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J. Anim. Sci.* **1974**, *39*, 1144–1149.

Pagl R, Aurich C, Kankofer M. Anti-oxidative Status and Semen Quality during Cooled Storage in Stallions. *J. Vet. Med.* **2006**, *A53*, 486–489.

Parks JE, Meachan TN, Saacke RG. Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. II. Effect of liposomes prepared from egg phosphatidylcholine and cholesterol on sperm cholesterol, phospholipids, and viability at 4 °C and 37 °C. *Biol. Reprod.* **1981**, *24*, 399–404.

Peña FJ, Rodríguez Martínez H, Tapia JA, Ortega Ferrusola C, González Fernández L, Macías García B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. *Reprod. Domest. Anim.* **2009**, *44*, 345–349.

Perumal P, Selvaraju S, Selvakumar S, Barik AK, Mohanty DN, Das S, Mishra PC. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reproduction in Domestic Animals* **2011**, *46*, 636–641.

Peyrot F, Ducrocq C. Potential role of tryptophan derivatives in stress responses characterized

- by the generation of reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* **2008**, *45*, 235–246.
- Pintado B, de la Fuente J, Roldan ER. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *J. Reprod. Fertil.* **2000**, *118*, 145–152.
- Platov EM. Cryopreservation of ram spermatozoa. Cryoconservation of Spermatozoa of Farm Animals. *Agropromizdat, Leningrad*, **1988**, 161–195.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* **1949**, *164*, 666–666.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* **2004**, *48*, 36–45.
- Purdy PH. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rum. Res.* **2006**, *6*, 215–225.
- Purdy PH, Graham JK. Effect of adding cholesterol to bull sperm membranes on sperm capacitation, the acrosome reaction, and fertility. *Biol. Reprod.* **2004**, *71*, 522–527.
- Quinn PJ, Chow PYW. Evidence that phospholipids protects spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* **1980**, *60*, 403–407.
- Quinn PJ, Chow P, White IG. Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J. Reprod. Fertil.* **1980**, *60*, 403–407.
- Quinn P, Stanger JD. Effect of purification of bovine serum albumin on the interaction of human semen with mouse ova in vitro. *Biol. Reprod.* **1980**, *22*, 134–140.
- Quinn PJ, White IG. Chemical and ultrastructural changes in ram spermatozoa after washing

cold, shock and freezing. *J. Reprod. Fertil.* **1969**, *18*, 209–220.

Reinhart BS, Fiser PS. Evaluation of artificial insemination techniques on fertility in laying hens. *Poult. Sci.* **1983**, *62*, 2285–2287.

Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **2009**, *44*, 175–200.

Reiter RJ, Tan DX, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and reproduction revisited. *Biol. Reprod.* **2009**, *81*, 445–456.

Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress – a review. *J. Biomed. Sci.* **2000**, *7*, 444–458.

Rey LR. Studies on the action of liquid nitrogen on cultures in vitro of fibroblasts. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **1957**, *147*, 460–466.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J. Androl.* **2005**, *26*, 15–24.

Roof DJ, Bowley S, Price LL, Matsas DJ. Comparison of two commercial extenders for cryopreservation of goat semen without sperm washing. *Theriogenology* **2012**, *77*, 412–420.

Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol. Reprod.* **2002**, *66*, 1061–1067.

Salamon S. Deep freezing of ram semen: recovery of spermatozoa after pelleting and comparison with other methods. *Aust. J. Biol. Sci.* **1968**, *21*, 355–360.

Salamon S. The survival of ram spermatozoa following pellet freezing below -79°C . *Aust. J. Biol. Sci.* **1970**, 23, 459–468.

Salamon S. *Artificial Insemination of Sheep*. Publicity Press, Chippendale, N.S.W., **1976**, 104.

Salamon S, Lightfoot RJ. Freezing of ram spermatozoa by the pellet method. I. The effect of diluent composition on survival of spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* **1969**, 22, 1527–1546.

Salamon S, Maxwell WM, Firth JH. Fertility of ram semen after storage at 58°C . *Anim. Reprod. Sci.* **1979**, 2, 373–385.

Salamon S, Maxwell WM. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* **1995**, 37, 185–249.

Salamon S, Maxwell WM. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* **2006**, 62, 77–111.

Salamon S, Visser D. Effect of composition of tris-based diluent and of thawing solution on survival of ram spermatozoa frozen by the pellet method. *Aust. J. Biol. Sci.* **1972**, 25, 605–618.

Saleh R, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* **2002**, 23, 737–752.

Salisbury GW, Fulle, HK, Willett EL. Preservation of bovine spermatozoa in yolk–citrate diluent and field results from its use. *J. Dairy Sci.* **1941**, 24, 905–910.

Salisbury GW, Hart RG, Lodge J. The fertile life of spermatozoa. *Perspect. Biol. Med.* **1976**, 19, 213–230.

Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregòn E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2009**, *72*, 663–668.

Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sang-cheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Zare Shahneh A, Zhandi M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small Rumin. Res.* **2013**, *112*, 123–127.

Satpathy GR, Torok Z, Bali R, Dwyre DM, Little E, Walker NJ, Tablin F, Crowe JH, Tsvetkova N.M. Loading red blood cells with trehalose: a step towards biostabilization. *Cryobiology* **2004**, *49*, 123–136.

Schembri MA, Major DA, Suttie JJ, Maxwell WMC, Evans G. Modification of standard freezing media to limit capacitation and maximise motility of frozen-thawed equine spermatozoa. *Aust. Vet. J.* **2003**, *81*, 748–751.

Shamsuddin M, Larsson B. In vitro development of bovine embryos after fertilization using semen from different donors. *Reprod. Domest. Anim.* **1993**, *28*, 77–84.

Sharafi M, Forouzanfar M, Hosseini SM, Hajian M, Ostadhosseini S, Hosseini L, Abedi P, Nili N, Rahmani HR, Javaheri AR, Nasr Esfahani MH. In Vitro comparison of soybean lecithin based extender with commercially available extender for ram semen cryopreservation. *IJFS* **2009**, *3*, 149–152.

Shiu SY, Li L, Siu SW, Xi SC, Fong SW, Pang SF. Biological basis and possible physiological implications of melatonin receptor-mediated signaling in the rat epididymis.

Biol. Signals Recept. **2000**, *9*, 172–187.

Sies H. Oxidative stress :oxidants and antioxidants. London Academic Press. **1991**.

Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Front. Biosci.* **1996**, *1*, 78–86.

Silva PFN, Gadella BM. Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* **2006**, *65*, 958–978.

Sinha M.P, Sinha AK, Singh BK, Prasad PL. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Theriogenology* **1996**, *41*, 237–243.

Smirnov IV, Davidenko VM, Shinkarenko IS, Ignatenko OI. The effect of some physical and biological factors on freezing of ram semen. *Zhivotnovodstvo* **1978**, *5*, 58–60.

Smith RL, Chowdhury MK, Pring DR. Mitochondrial DNA rearrangements in Pennisetum associated with reversion from cytoplasmic male sterility to fertility. *Plant. Mol. Biol.* **1987**, *9*, 277–286.

Söderquist L, Madrid-Bury N, Rodriguez-Martinez H. Influence of thawing procedure on membrane damage in ram spermatozoa frozen in mini straws. In: *13th Int. Congr. Anim. Reprod., Sydney*, **1996**, *2*, 2–11.

Sonmez M, Yuce A, Turk G. The protective effects of melatonin and Vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod. Toxicol.* **2007**, *23*, 226–231.

Spizziri BE, Fox MH, Bruemmer JE, Squires EL, Graham JK. Cholesterol-loaded-cyclodextrins and fertility potential of stallions spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* **2010**, *118*, 255–264.

Storey BT, Noiles EE, Thompson KA. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* **1998**, *37*, 46–58.

Stradaoli G, Noro T, Sylla L, Monaci M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: comparison between two extenders. *Theriogenology* **2007**, *67*, 1249–1255.

Succu S, Berlinguerl F, Pasciu V, Satta V, Leoni GG, Naitana S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. *J. Pineal Res.* **2011**, *50*, 310–318.

Tada N, Sato M, Amann E, Ogawa S. Effect of pre-freezing equilibration and postthawing centrifugation on the fertilizing capacity of frozen mouse epididymal spermatozoa. *Cryo. Letters* **1993**, *14*, 195–206.

Tomàs C, Blanch E, Mocé E. Cholesterol addition improves goat sperm quality after cryopreservation. In: Gomez E (ed.), 1st Joint International Meeting of AERA- BAS, Gijón, Spain. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 53 OC.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J. Pineal Res.* **2007**, *42*, 28–42.

Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Tamura H, Reiter RJ. Melatonin as a naturally occurring co-substrate of quinone reductase-2, the putative MT3 melatonin membrane receptor: hypothesis and significance. *J. Pineal Res.* **2007**, *43*, 317–320.

- Tartaglione CM, Ritta MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* **2004**, *62*, 1245–1252.
- Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LE. Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil.* **1972**, *30*, 493–497.
- Tesarik J, Greco E, Mendonza C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 611–615.
- Thibier M, Guerin B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *62*, 233–251.
- Tomas C, Blanch E, Mocé E. Cholesterol addition improves goat sperm quality after cryopreservation. In: Gomez E (ed.), 1st Joint International Meeting of AERA- BAS, Gijon, Spain. *Reprod. Domest. Anim.* **2008**, *43*, 53 (Abstract OC2).
- Van Wagendonk-de Leeuw AM, Haring RM, Kalal LMTE, Dea Dass JHG. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology* **2000**, *54*, 57–67.
- Varnavskij A, Varnavskaja VA. Results of artificial insemination with frozen semen. *Ovtsevodstvo* **1976**, *9*, 19–20.
- Visconti PE, Galantino-Homer H, Ning X, Moore GD, Valenzuela JP, Jorgez CJ, Alvarez JG, Kopf GS. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm. beta-cyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 3235–3242.
- Visser D. Studies of factors affecting the survival and fertility of ram and boar spermatozoa following freezing in Tris-based diluents. *Ph.D. Thesis, University of Sydney, Sydney*, **1975**.

Visser D, Salamon S. The effect of freezing method on the survival of ram spermatozoa. *S. Afr. J. Anim. Sci.* **1974**, *4*, 157–163.

Visser D, Salamon S. Fertility following inseminations with frozen–thawed reconcentrated and unconcentrated ram semen. *Aust. J. Biol. Sci.* **1974**, *27*, 423–425.

Walters EM, Benson JD, Rieke A, Graham JK, Critser JK. Cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin improves boar spermatozoa cryoprotectant addition and removal tolerance. In: Kubisch HM, Tian XC (eds), 35th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society (IETS), San Diego, CA (USA). *Reprod. Fertil. Dev.* **2009**, *21*, 140–141 (Abstract 80).

Watson PF. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: Morris GJ, Clarke A, editors. *Effects of Low Temperatures on Biological Membranes*. Academic Press; New York, NY: **1981**, 189–218.

Watson PF. The role of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.* **1981**, *2*, 337–340.

Watson PF. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 degrees C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fertil.* **1981**, *62*, 483–492.

Watson PF. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. *Reprod. Dom. Anim.* **1996**, *56*, 345–356.

Watson PF. The causes of reduced fertility with cryo- preserved semen. *Anim. Reprod. Sci.* **2000**, *60–61*, 481–492.

Watson PF, Martin IC. Regions of the freezing curve causing changes in structure and viability of ram sperm. *Nature* **1974**, *251*, 315–316.

Watson PF, Martin ICA. The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5 degrees C. *Aust. J. Biol. Sci.* **1975**, *28*, 145–152.

Watson PF, Martin IC. Effects of egg yolk, glycerol and the freezing rate on the viability and acrosomal structures of frozen ram spermatozoa. *Aust. J. Biol. Sci.* **1975**, *28*, 153–159.

Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature* **1971**, *233(5315)*, 125-6.

Wildt DE, Rall WF, Crister JK, Monfort SL, Seal US. Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* **1997**, *47*, 689–698.

Willett EL, Salisbury GW. The effect of various diluters, cooling rate, temperature of storage, and some other factors, on the livability of spermatozoa in stored samples of bull semen. *Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem.* **1942**, 249.

Wilhelm KH, Graham JK, Squires EL. Effects of phosphatidylserine and cholesterol liposomes on the viability, motility, and acrosomal integrity of stallion spermatozoa prior to and after cryopreservation. *Cryobiology* **1996**, *33*, 320–329.

White IG. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.* **1993**, *5*, 639–658.

Yancey PG, Rodriguez WV, Kilsdonk EPC, Stoudt GW, Johnson WJ, Phillips MC, Rothblat GH. Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. Demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 16026–16034.

Yu BP. Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physical. Rev.* **1994**,

74, 139–162.

Yu K, Chen Q, Liu H, Zhan Y, Stevens JL. Signalling the molecular stress response to nephrotoxic and mutagenic cysteine conjugates: differential roles for protein synthesis and calcium in the induction of c-fos and c-myc mRNA in LLC-PK1 cells. *J. Cell. Physiol.* **1994**, *161*, 303–311.

Zahn FS, Papa FO, Dell'Aqua JA Jr. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fertility. *Theriogenology* **2002**, *58*, 237–240.

Zamfirescu S, Vicovan A, Barbulescu I. Results of artificial insemination in sheep using frozen semen. *Rev. Cresterea Anim.* **1980**, *30*, 11–15.

Zeng W, Terada T. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Reprod. Fertil. Dev.* **2000**, *12*, 223–228.

Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 1311–1324.

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Salvatore Naitana per avermi dato l'opportunità di svolgere questo dottorato, la Dott.ssa Fiammetta Berlinguer e il Dott. Giovanni Leoni.

Ringrazio la Prof.ssa Maria Teresa Zedda per la disponibilità concessami nell'utilizzo degli animali.

GRAZIE di cuore alla Dott.ssa Sara Succu per avermi sostenuto, insegnato e seguito durante tutto il percorso di dottorato, la sua presenza è stata indispensabile per la riuscita di questo lavoro.

Un grazie speciale alla Dott.ssa Valeria Pasciu per il prezioso aiuto, i consigli e la pazienza dimostratami durante questi anni.

Grazie alle Dott.sse Maria Elena Manca e Laura Torres Rovina per aver condiviso con me questa esperienza, sia nei momenti di necessità che di divertimento.

Ringrazio i Sigg. Walter Porcu e Giuseppe Sanna per la collaborazione.

Grazie ai "miei" becchi Gandalf il Grigio, Nerino, becco Nerro Sardo, Igor e becco Bianco per essere stati i collaboratori più fedeli.