

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
**MORFOFISIOLOGIA E PATOLOGIA VETERINARIA CON
APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE**

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H1

Settore Scientifico disciplinare: VET/02

CONSERVAZIONE DEL SEME SORTATO DI SUINO

Presentata da: **Dott.ssa Claudia Vallorani**

Coordinatore Dottorato

Prof. Eraldo Seren

Relatore

Prof.ssa Giovanna Galeati

Correlatore

Prof.ssa Marcella Spinaci

Esame finale anno 2012

INDICE

Riassunto	5
Abstract	7

INTRODUZIONE

Metodi di conservazione del seme di maiale	8
<i>Crioconservazione</i>	9
<i>Conservazione allo stato liquido</i>	15
<i>Incapsulazione degli spermatozoi</i>	22
Sessaggio degli spermatozoi	28
Danni post-sorting e conservazione del seme sortato di maiale	36
Utilizzo di antiossidanti nella conservazione del seme sortato	44
Impiego del seme sortato nel maiale	48

PARTE SPERIMENTALE

<i>SCOPO DELLA RICERCA</i>	53
-----------------------------------	----

<i>MATERIALI E METODI</i>	54
----------------------------------	----

Prelievo dell'eiaculato	54
-------------------------	----

Flow sorting	55
--------------	----

Valutazione dell'integrità della membrana plasmatica (vitalità)	55
---	----

Valutazione dell'integrità dell'acrosoma	57
Valutazione dell'esocitosi acrosomiale	58
Valutazione dell'attivazione delle caspasi	60
Immunolocalizzazione dell'Hsp70	61
Western Blot dell'Hsp70	63
Maturazione <i>in vitro</i> degli oociti	64
Fecondazione <i>in vitro</i>	64
Incapsulazione del seme	66

DISEGNO SPERIMENTALE

ESPERIMENTO 1

1.1 Valutazione dei parametri qualitativi del seme di suino sortato e conservato per 24-26 h a 15°C	67
1.2 Fecondazione <i>in vitro</i> utilizzando il seme di suino sortato e conservato 24-26 h a 15°C	67

ANALISI STATISTICA ESPERIMENTO 1

RISULTATI ESPERIMENTO 1

1.1.1 Integrità della membrana plasmatica	68
1.1.2 Esocitosi acrosomiale	69
1.1.3 Immunolocalizzazione dell'Hsp70 e Western blotting	70
1.2 Fecondazione <i>in vitro</i>	72

DISCUSSIONE ESPERIMENTO 1	74
ESPERIMENTO 2	
2.1 Effetto degli antiossidanti sugli spermatozoi colorati e sortati	79
2.2 Effetto dell'aggiunta di sostanze antiossidanti con o senza plasma seminale sugli spermatozoi sortati e conservati per 24 h a 15°C	79
ANALISI STATISTICA ESPERIMENTO 2	80
RISULTATI ESPERIMENTO 2	80
2.1 <i>Effetto degli antiossidanti sugli spermatozoi colorati e sortati di suino</i>	80
2.1.1 <i>Integrità della membrana plasmatica</i>	80
2.1.2 <i>Integrità acrosomiale</i>	81
2.1.3 <i>Attivazione delle caspasi</i>	82
2.1.4 <i>Immunolocalizzazione dell'Hsp70</i>	85
2.2 <i>Effetto dell'aggiunta di sostanze antiossidanti con o senza plasma seminale sugli spermatozoi sortati e conservati per 24h a 15°C</i>	87
2.2.1 <i>Integrità della membrana plasmatica</i>	87
2.2.2 <i>Integrità acrosomiale</i>	87
2.2.3 <i>Attivazione delle caspasi</i>	88
2.2.4 <i>Immunolocalizzazione dell'Hsp70</i>	90

DISCUSSIONE ESPERIMENTO 2	92
ESPERIMENTO 3	
3.1 Valutazione dei parametri qualitativi del seme di suino fresco e sortato conservato allo stato liquido o mediante incapsulazione	97
3.2 Valutazione della capacità fecondante del seme sortato di suino conservato allo stato liquido o incapsulato	97
ANALISI STATISTICA ESPERIMENTO 3	97
RISULTATI ESPERIMENTO 3	98
3.1 Valutazione dei parametri qualitativi del seme di suino fresco e sortato conservato allo stato liquido o mediante incapsulazione	98
3.1.1 Integrità della membrana plasmatica	98
3.1.2 Integrità acrosomiale	100
3.2 Valutazione della capacità fecondante del seme sortato di suino conservato allo stato liquido o incapsulato	103
DISCUSSIONE ESPERIMENTO 3	108
CONCLUSIONI	111
BIBLIOGRAFIA	115

Riassunto

Gli spermatozoi di suino sottoposti alla procedura di sessaggio mediante citofluorimetria presentano una serie di modificazioni morfo-funzionali che compromettono nel tempo la loro sopravvivenza e la capacità fecondante. Questi spermatozoi, inoltre, a causa della sensibilità ai danni indotti dalla crioconservazione, vengono solitamente conservati allo stato liquido a 15-17°C, con conseguente ulteriore peggioramento nel tempo della qualità delle cellule spermatiche sessate.

Lo scopo della ricerca è stato quello di valutare le modificazioni di alcune caratteristiche morfo-funzionali degli spermatozoi in seguito a *sex-sorting* e conseguente conservazione. Successivamente si è cercato di migliorare i parametri qualitativi del seme sessato mediante l'aggiunta di sostanze antiossidanti e la messa a punto di una nuova metodica di conservazione.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che la procedura di sessaggio e la conseguente conservazione per 24-26 ore a 15°C hanno indotto un peggioramento significativo delle caratteristiche morfo-funzionali (vitalità, integrità acrosomiale, quantità e distribuzione dell'Hsp70, capacità fecondante).

Mentre l'azione degli antiossidanti non si è rivelata efficace nel miglioramento della qualità degli spermatozoi durante le fasi di colorazione e passaggio attraverso il citofluorimetro, l'azione congiunta del plasma seminale e degli antiossidanti superossido-dismutasi ed epigallocatechina-3-gallato ha indotto un miglioramento significativo della vitalità degli spermatozoi.

Per la conservazione del seme di suino è stata testata la tecnica di incapsulazione in membrane di alginato di bario che permette, durante l'inseminazione artificiale, un rilascio graduale degli spermatozoi e l'utilizzo di un quantitativo inferiore di materiale seminale. L'applicazione di tale tecnica per la conservazione degli spermatozoi di suino sessati non sembra provocare un calo significativo della vitalità, dell'integrità acrosomiale e dell'efficienza totale di fecondazione rispetto al seme sortato e conservato diluito suggerendo futuri studi in vivo.

Una migliore conoscenza dei danni indotti da queste tecnologie e la loro minimizzazione potrà stimolare in futuro l'utilizzo su vasta scala del seme sessato nel suino.

STORAGE OF BOAR SEXED SEMEN

Abstract

Boar spermatozoa submitted to the sorting procedure show several morpho-functional modifications effective in compromising their survival and fertilization ability. Moreover, boar spermatozoa, because of their susceptibility to damages induced by cryopreservation, are usually stored at 15-17°C after the sorting procedure; however, also the conservation at liquid state implies the worsening of semen quality. The aims of this research were: 1) to evaluate morpho-functional characteristics of sperm cells submitted to *sex-sorting* and consequent storage; 2) to try to improve the quality of sorted semen by the addition of antioxidants; 2) to set up a new storage method.

Our results evidence a decreased quality of boar sorted-stored spermatozoa in terms of: viability, acrosome integrity, amount and localization of Hsp70, fertilizing ability. During the staining step and the passage through the cytofluorimeter, antioxidants were not effective in improving sperm cells morpho-functional characteristics, while the addition of superoxide dismutase or epigallocatechin-3-gallate associated with seminal plasma induced an increase of viability of sorted boar spermatozoa stored 24 h at 15°C.

Some researchers have utilized encapsulation in barium alginate membrane to store boar sperm cells. This technique allows a constant release of spermatozoa in sow reproductive system, avoiding the double/triple intervention of insemination and reducing the number of spermatozoa/insemination. The application of this technique in order to store boar sperm cells after sorting did not induce any impairment of sperm morpho-functional characteristics (viability, acrosome integrity, total efficiency of insemination) compared to sorted spermatozoa stored at liquid state, thus demonstrating the possibility to use this method to improve the reproductive performance of boar sorted semen.

INTRODUZIONE

METODI DI CONSERVAZIONE DEL SEME DI MAIALE

Negli ultimi decenni l'interesse verso lo sviluppo delle tecnologie riproduttive nella specie suina allo scopo di migliorare l'efficienza della produzione è aumentato notevolmente.

L'introduzione degli spermatozoi nel tratto genitale femminile mediante inseminazione artificiale (IA) rappresenta la prima tecnologia riproduttiva utilizzata negli animali domestici. Il primo tentativo di IA è stato effettuato in Russia da Ivanov all'inizio del '900 (Foote, 2002) e negli anni il numero delle femmine inseminate artificialmente non ha cessato di aumentare.

L'inseminazione artificiale nel suino è stata impiegata sin dagli anni '30 ma il vero sviluppo e l'applicazione commerciale nella produzione suina ha avuto luogo a partire dagli anni '80. L'attuale incremento dell'utilizzo della fecondazione artificiale nel suino è dovuto all'aumento della domanda di materiale seminale di verri di elevata genealogia, all'aumento del profitto ottenibile dalle carcasse di alta qualità e al miglioramento dei sistemi di trasporto che fa in modo che il seme sia disponibile in tempi brevi in tutto il mondo. Di conseguenza è nata l'esigenza di migliorare i metodi di conservazione del seme preservandone le caratteristiche funzionali e quindi la capacità fecondante. Le tecniche di conservazione del seme sono sostanzialmente due: la conservazione allo stato liquido a temperature di refrigerazione e il congelamento in azoto liquido.

Sin dai primi studi sulla conservazione del seme di suino è stato dimostrato che solo una percentuale di spermatozoi è in grado di sopravvivere ad entrambi i processi di conservazione. Allo stesso modo è stato osservato come al diminuire della temperatura si riduca la percentuale di spermatozoi in grado di mantenere l'integrità della membrana e delle ultrastrutture.

Di fronte alla necessità di conservare il seme a lungo termine la tecnica più efficace è sicuramente il congelamento in azoto liquido. D'altra parte la refrigerazione del seme a 15-20°C costituisce un metodo efficace per una conservazione a medio termine che permetta di evitare i danni legati al congelamento. Inoltre, sebbene il tempo di sopravvivenza del seme refrigerato sia molto più breve di quello del seme congelato, il costo economico della refrigerazione è inferiore a quello del congelamento.

In seguito alla valutazione di tutti questi aspetti, l'utilizzo di una metodica di conservazione del seme piuttosto che di un'altra dipende strettamente dagli aspetti tecnici ed economici correlati alla specie.

Nonostante le difficoltà riscontrate, tuttora gli sforzi dei ricercatori nell'ambito delle tecnologie riproduttive sono rivolti all'individuazione di nuove tecniche o di nuove sostanze in grado di migliorare la capacità fecondante sia degli spermatozoi di maiale congelati che di quelli conservati allo stato liquido.

Crioconservazione

L'utilizzo della criopreservazione per la conservazione a lungo termine del seme di verro è da molti considerato un metodo efficace per mantenere materiale genetico di importante valore economico, preservare la diversità genetica, fornire tecniche d'allevamento più efficienti e controllare la trasmissione di patogeni (Guthie e Welsh, 2005). La metodica di congelamento degli spermatozoi di suino è stata messa a punto negli anni '60 ma solo nel 1971 sono stati ottenuti i primi casi di fecondazione mediante l'utilizzo dell'inseminazione artificiale (IA). Nonostante gli sforzi documentati per ottenere livelli accettabili di fertilità e prolificità in seguito a IA, ancora oggi la capacità fecondante degli spermatozoi di suino crioconservati è abbastanza bassa rispetto ai valori ottenuti nelle altre specie poiché, oltre al crollo della vitalità e della motilità, le cellule spermatiche mostrano una riduzione del tempo di sopravvivenza post-scongelo. Vari studi hanno infatti dimostrato che, rispetto agli spermatozoi delle altre specie domestiche, le cellule spermatiche di suino

sono maggiormente suscettibili allo stress cellulare causato dal cambiamento dell'equilibrio osmotico, dall'esposizione alle basse temperature e dall'azione tossica dei crioprotettori. Gli spermatozoi di suino, a causa dell'elevato contenuto di lipidi insaturi, sono particolarmente sensibili allo shock da freddo quando vengono sottoposti a temperature inferiori ai 15°C (Watson, 2000).

In tutti i protocolli di congelamento la prima fase prevede un rapido raffreddamento dalla temperatura corporea a temperature prossime a quelle di congelamento che è responsabile dell'inevitabile riduzione della percentuale di spermatozoi in grado di mantenere l'integrità di membrana, delle ultrastrutture e dei componenti biochimici (Johnson et al., 2000). La membrana plasmatica è il sito primario del danno da freddo (Bayley et al., 2008) la cui azione influisce negativamente sui componenti proteici e lipidici della membrana stessa. Il congelamento induce l'adesione e il concomitante distacco di proteine dalla superficie dello spermatozoo come osservato nella specie suina da Huang e coautori (2009). I processi di congelamento e scongelamento hanno effetti evidenti anche sui lipidi presenti sulla membrana plasmatica dello spermatozoo (Buhr et al., 1994). Le fluttuazioni della temperatura e la deidratazione della cellula inducono modificazioni nella separazione di fase dei lipidi con un conseguente riordinamento laterale dei componenti di membrana (Drobnis et al., 1993) e la perdita degli acidi grassi polinsaturi e del colesterolo (Chakrabarty et al., 2007). Queste modificazioni della componente lipidica alterano la permeabilità di membrana dello spermatozoo all'acqua, agli ioni e ai crioprotettori che portano all'indebolimento della cellula e alla riduzione della sua capacità di resistere agli stress cui viene sottoposta (Leahy e Gadella, 2011).

I danni post-crioconservazione, inoltre, sembrano essere in parte provocati da un aumento della produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS). Gli spermatozoi di suino, possedendo una membrana plasmatica ricca di acidi grassi insaturi, sono particolarmente sensibili alla perossidazione che provoca danni di membrana, inibizione della respirazione cellulare, perdita degli enzimi intracellulari (White,

1993), aumento della percentuale di difetti morfologici (Aziz et al., 2007), frammentazione del DNA (Baumber et al., 2003), diminuita capacità di fusione con l'oocita e conseguente compromissione della fecondazione. Molti autori dopo aver identificato le modificazioni indotte dal congelamento hanno evidenziato la somiglianza di queste alterazioni a quelle che avvengono durante il processo di capacitazione. I cambiamenti indotti dalla crioconservazione portano, dal punto di vista funzionale, alla destabilizzazione della membrana, al cambiamento del pattern di motilità, all'aumento della fosforilazione dei residui di tirosina delle proteine (Kumaresan et al., 2011). Questo potrebbe costituire un vantaggio poiché teoricamente permetterebbe agli spermatozoi di bypassare il processo di capacitazione subito dopo lo scongelamento essendo già in grado di andare incontro alla reazione acrosomiale. In realtà le modificazioni simil-capacitative che gli spermatozoi subiscono durante i processi di crioconservazione sembrano seguire un pathway diverso rispetto a quello osservato durante il fisiologico processo di capacitazione. Bravo e collaboratori (2005) hanno dimostrato differenze nei pattern di fosforilazione della tirosina tra gli spermatozoi di suino capacitati in vitro e quelli crioconservati. Le diverse caratteristiche che differenziano le cellule spermatiche di maiale da quelle delle altre specie domestiche devono essere prese in considerazione nella progettazione dei protocolli di congelamento del seme di questa specie. Il successo di un protocollo di congelamento deriva dalla completa comprensione dei fattori che influenzano la capacità degli spermatozoi di essere congelati e dall'interazione di questi. Questi fattori possono essere suddivisi in due categorie: i fattori interni, cioè quelli che influenzano la qualità degli spermatozoi e le differenze tra gli eiaculati appartenenti a verri diversi e i fattori esterni, cioè i diluitori, i crioprotettori, le temperature e le metodiche utilizzate durante il processo di congelamento (Johnson et al., 2000). Per quanto riguarda i fattori interni bisogna innanzitutto considerare le notevoli variazioni della capacità degli spermatozoi, appartenenti a soggetti differenti, di resistere ai danni correlati alla criopreservazione. Nel maiale, in particolare, è il fattore che riveste maggiore importanza poiché capace

di influenzare la criosopravvivenza (Roca et al., 2006) e quindi di indirizzare la scelta dei donatori non solo in base al valore genetico ma anche in base alla crioconservabilità. Le ragioni di queste notevoli differenze individuali non sono state ancora del tutto comprese ma sono state studiate numerose cause, e potenziali marker responsabili della diversa resistenza al processo di congelamento come la regolazione del volume cellulare, i fattori genetici, l'espressione di proteine costitutive e la composizione proteica del plasma seminale (Leahy e Gadella, 2011). Differenze nella capacità di subire il processo di congelamento sono state registrate anche negli spermatozoi di eiaculati diversi dello stesso soggetto ed addirittura in quelli appartenenti a differenti frazioni dello stesso eiaculato (Pena et al., 2006).

I fattori esterni, a differenza di quelli interni, possono essere manipolati allo scopo di migliorare le caratteristiche funzionali degli spermatozoi post-congelamento. A questo scopo molti ricercatori hanno focalizzato le ricerche nell'individuare dei punti critici del processo di congelamento-scongelo tentando di minimizzare i danni causati alle cellule spermatiche. I fattori che influenzano e sui quali si può intervenire per ottenere materiale seminale congelato di buona qualità sono:

- la scelta dei crioprotettori;
- l'aggiunta di additivi come gli antiossidanti;
- l'uso di congelatori programmabili;
- l'utilizzo di un buon sistema di stoccaggio.

I crioprotettori sono sostanze a diversa composizione chimica che hanno in comune un'elevata solubilità in acqua associata ad una tossicità dipendente dalla concentrazione di utilizzo. Il primo crioprotettore utilizzato è stato il glicerolo che è stato aggiunto accidentalmente ad un medium di diluizione degli spermatozoi. Il glicerolo è altamente solubile in acqua grazie alle interazioni tra i legami idrogeno e può penetrare attraverso la membrana plasmatica, ma a bassa velocità. Poiché il glicerolo interferisce con il metabolismo spermatico a temperatura ambiente, viene solitamente aggiunto solo dopo il raffreddamento a 5°C. Una volta che il glicerolo

viene a contatto con gli altri soluti della soluzione di diluizione abbassa il loro punto di congelamento. Ad ogni modo, la sola presenza di questo crioprotettore aumenta la viscosità della soluzione in seguito a raffreddamento portando ad un ritardo sia nella formazione dei cristalli di ghiaccio che nella velocità di deidratazione. Oltre al glicerolo, un'ampia gamma di altri soluti (alcooli, zuccheri, dioli e ammidi) sono stati utilizzati allo scopo di testare la loro capacità di crioprotezione (Fuller, 2004). Gli spermatozoi di verro hanno reagito in maniera variabile all'azione di queste sostanze. Mentre gli alcoli e i dioli sembrano indurre il blebbing della membrana plasmatica (ossia la formazione di protrusioni della membrana), l'utilizzo degli zuccheri (ad esempio saccarosio e trealosio) non sembra apportare miglioramenti significativi alla percentuale di criosopravvivenza degli spermatozoi rispetto al glicerolo (Hu et al., 2008). D'altra parte, sostituendo il glicerolo con le ammidi (formamide, metil- e dimetilformamide; acetamide, metil- e dimetilacetamide) sono stati ottenuti risultati positivi, probabilmente perché l'ammidide diffonde in maniera più efficace attraverso la membrana plasmatica rispetto al glicerolo, causando in questo modo un minor danno osmotico durante lo scongelamento (Bianchi et al., 2008). Nel tentativo di migliorare le caratteristiche morfo-funzionali delle cellule spermatiche di verro dopo crioconservazione sono stati aggiunti additivi nelle soluzioni di congelamento e di scongelamento. Tra gli additivi più testati che hanno dato i migliori risultati possono essere annoverate certamente le sostanze antiossidanti. Infatti la membrana plasmatica degli spermatozoi di verro contiene un quantitativo di acidi grassi insaturi tale da essere particolarmente sensibile all'azione perossidativa dei radicali liberi dell'ossigeno prodotti dalla manipolazione del seme durante la procedura di congelamento. Cerolini et al. (2001) hanno osservato un aumento dell'attività della superossido dismutasi dopo lo scongelamento degli spermatozoi di verro indicativa del tentativo dell'enzima di minimizzare i danni ROS-indotti mediante la sua attività di scavenger dei radicali liberi. Sono state utilizzate diverse sostanze antiossidanti durante gli step previsti dalle diverse metodiche di congelamento. Ad esempio Pena et al. (2003) hanno osservato un miglioramento della motilità e del potenziale di

membrana mitocondriale post-scongelo mediante l'uso di una sostanza analoga alla Vitamina E (Trolox), mentre Roca et al. (2005), aggiungendo la soluzione di congelamento con la superossido dismutasi (SOD) o con la catalasi (CAT) o con la combinazione dei due antiossidanti, hanno ottenuto un aumento significativo della sopravvivenza spermatica post-scongelo. Un altro fattore considerato importante per minimizzare gli stress a cui gli spermatozoi vengono sottoposti migliorandone le caratteristiche funzionali e quindi la capacità fecondante, è il controllo delle temperature di congelamento. La diminuzione della temperatura deve essere un processo graduale gestito da appositi congelatori programmabili. Le velocità di raffreddamento ottimali sono quelle che sostanzialmente sono in grado di diminuire il periodo durante il quale il calore viene rilasciato dal campione nel corso dei cambiamenti di fase dell'acqua (Rodriguez-Martinez e Wallgreen, 2010).

Anche l'uso di un sistema di stoccaggio adeguato è un fattore modificabile che può influenzare la criosopravvivenza del seme di verro. Gli spermatozoi di verro sono stati stoccati in pailletes di plastica di volumi diversi (da 0.25 a 5 ml) (Johnson et al., 2000), pailletes piatte da 5 ml (Weitze et al., 1987), di metallo, o contenitori di plastica (semen bags) di vari tipi e costituzione (Karosas e Rodriguez-Martinez 1993). Quest'ultime, denominate "FlatPacks" sono in grado di mantenere una percentuale di sopravvivenza uguale o addirittura maggiore a quella ottenuta con le pailletes da 0.25 ml, oltre a possedere volumi di 5 ml che non rende necessario scongelare diverse pailletes per la fecondazione. Le "FlatPacks" sono considerate criobiologicamente convenienti perché molto sottili e dotate di un'ampia superficie in grado di dissipare il calore durante il raffreddamento e riscaldare in maniera rapida durante lo scongelamento. Mediante l'uso delle "FlatPacks" sono stati ottenuti buoni risultati in seguito a fecondazione artificiale (Eriksson et al., 2002). Recentemente gli spermatozoi di verro sono stati congelati ad alte concentrazioni ed in piccoli volumi in contenitori chiamati "MiniFlatPack" (MFP), contenenti 1-2 miliardi di spermatozoi/ml (Bwanga et al., 1991). In seguito all'uso delle MFP non solo il congelamento è risultato più omogeneo rispetto alla pailletes, ma anche la

criosopravvivenza e la capacità fecondante testata mediante l'utilizzo dell'IA profonda intrauterina (Rodriguez-Martinez e Wallgren, 2010). A tutt'oggi nonostante i miglioramenti apportati alla tecnica di congelamento degli spermatozoi di verro, questa pratica non è riuscita a raggiungere risultati tali da permetterne la commercializzazione su larga scala.

Conservazione allo stato liquido

L'utilizzo di seme di maiale conservato allo stato liquido per l' IA è aumentato di circa tre volte negli ultimi 15 anni ed è ampiamente diffuso in tutta Europa; infatti, approssimativamente il 99% delle dosi di seme commerciali per l'IA nel maiale sono costituite da seme diluito ed utilizzato il giorno stesso o conservato a breve termine a temperature di refrigerazione (15-17°C) (Johnson et al., 2000b). Il maggior vantaggio dato dall'uso di seme diluito rispetto a quello congelato consiste nel mantenimento di una maggiore capacità fecondante. Ma in realtà, nonostante l'ampio utilizzo del seme conservato allo stato liquido, vari studi hanno ampiamente dimostrato come la conservazione per 12-24 ore del seme porti ad una diminuzione della fertilità, in particolare al calo del numero di nati /parto (Waberski et al., 1994a; Christensen et al., 2004). Di conseguenza, uno degli obiettivi più importanti nella riproduzione suina rimane la preservazione della capacità fecondante degli spermatozoi conservati allo stato liquido per diversi giorni. Gli spermatozoi di maiale, a causa della peculiare composizione della loro membrana plasmatica sono particolarmente sensibili ai danni provocati dallo shock da freddo e dalla diluizione (White, 1993). Per questo motivo, le tecniche di conservazione del seme suino sono molto differenti rispetto a quelle utilizzate per il mantenimento del materiale seminale delle altre specie domestiche. Gli spermatozoi eiaculati vengono diluiti e successivamente vengono raffreddati fino a temperature di 15°-16°C.

Watson (1996) ha ipotizzato che lo shock termico possa essere correlato ad un cambiamento della composizione lipidica del doppio strato di membrana capace di

influenzare la fluidità della membrana plasmatica. Quando si verifica un abbassamento della temperatura, i movimenti laterali dei fosfolipidi di membrana sono limitati e possono portare ad una transizione dalla fase di fluido a quella di gel. A causa delle diverse temperature di transizione per i differenti lipidi di membrana possono verificarsi delle separazioni di fase, responsabili dell'unione irreversibile di alcune proteine (De Leeuw et al., 1990). Sicuramente la risposta alle basse temperature è fortemente collegata alla composizione della membrana delle cellule; infatti sono state osservate notevoli differenze nei cambiamenti strutturali indotti dal freddo nella membrana spermatica bovina e in quella suina. Sebbene la composizione in acidi grassi dei fosfolipidi determini il comportamento nei cambiamenti di fase, è riduttivo stimare la stabilità delle membrane degli spermatozoi di maiale sulla base della diversa composizione fosfolipidica. Un altro fattore che influenza il comportamento termotropico delle membrane è la percentuale di colesterolo. Negli spermatozoi di maiale il rapporto colesterolo/ fosfolipidi è molto basso e il colesterolo ha una distribuzione asimmetrica, essendo presente maggiormente nello strato esterno piuttosto che in quello interno della membrana plasmatica; questa differenza di distribuzione rende lo strato interno particolarmente vulnerabile allo shock termico. La conseguente riorganizzazione delle proteine di membrana indotta dal freddo, sebbene parzialmente reversibile, può influenzare la funzionalità della membrana aumentandone la permeabilità, riducendo l'attività enzimatica e la diffusione controllata dei processi di membrana (De Leeuw et al., 1990). Anche la diluizione del seme in seguito a prelievo costituisce uno step critico che può influenzare la capacità fecondante del seme suino. Le teorie finora adottate non sono state in grado di spiegare in maniera ben definita l'“effetto diluizione”; Watson (1995) ha ipotizzato che i danni provocati alle cellule spermatiche dall'aggiunta del diluente siano in realtà causati dalla perdita di componenti extracellulari e dall'eccessiva diluizione degli agenti protettivi presenti nel plasma seminale. L'aggiunta del diluente provoca infatti una parziale diluizione dei componenti presenti nel plasma seminale in grado di proteggere le membrane plasmatiche degli

spermatozoi durante la conservazione inficiandone di conseguenza la capacità fecondante (Kommissrud et al., 2002). Nel plasma seminale infatti sono presenti sostanze proteiche stimolanti la motilità (Harrison et al., 1982), sostanze con azione antiossidante (Strzezek, 2002) e fattori decapacitanti che prevengono una prematura reazione acrosomiale (Fraser et al., 1990; Roberts et al., 2003). Il peggioramento delle caratteristiche morfo-funzionali che gli spermatozoi di suino subiscono in seguito a diluizione può però essere in parte evitato controllando la temperatura, la composizione del medium utilizzato ed anche il rapporto di diluizione seme: diluente. Althouse e collaboratori (1998) hanno dimostrato che la temperatura critica per il seme di maiale è 12°C. Oggi, durante le procedure di manipolazione del seme, le condizioni di conservazione vengono costantemente controllate e la temperatura non raggiunge valori al di sotto dei 16-17°C. L'utilizzo di temperature di conservazione così alte, rispetto a quelle utilizzate nelle altre specie domestiche, da una parte evita i danni responsabili del calo della funzionalità cellulare, ma dall'altra impedisce la riduzione completa dell'attività metabolica e la completa inibizione della crescita microbica.

Il preriscaldamento del diluente aumenta i costi e il lavoro nei centri di IA, ma non è stato ancora del tutto chiarito se questa pratica abbia benefici evidenti sulla qualità del seme (Petrunina et al., 2005; Waberski et al., 2008). Pursel e coautori (1972) hanno dimostrato che l'acclimatamento a 30°C per diverse ore in seguito a diluizione riduce i danni a livello degli spermatozoi conservati a 17°C, mentre Petrunina et al. (2005) hanno evidenziato un effetto negativo dell'acclimatamento a 32°C.

I medium di diluizione utilizzati per la manipolazione del seme di suino possono essere classificati in diluitori *short-term* e *long-term*; la differenza tra questi due tipi di medium consiste nella capacità dei diluitori *long-term* di mantenere la capacità fecondante degli spermatozoi per un periodo di tempo maggiore.

Tutti i diluitori sono formulati per aumentare la capacità di conservazione fornendo agli spermatozoi una fonte energetica (glucosio), sali basici per mantenere un adeguato equilibrio osmotico e antibiotici per inibire la crescita batterica (Kuster e

Althouse, 1999); inoltre devono possedere determinati valori di pH, osmolarità e determinati tipi di ioni. Il pH del seme di suino appena eiaculato varia tra 7.2 e 7.5 e sotto questo valore la motilità e il metabolismo della cellula spermatica vengono gradualmente ridotti. I diluitori *long-term* contengono tamponi zwitterionici organici come il TES e l'HEPES (Crabo et al., 1972; Weitze, 1990) che catturano i metalli pesanti e controllano il pH. La forza ionica del diluente invece non sembra essere di primaria importanza nei medium utilizzati per gli spermatozoi di maiale dove l'osmolalità viene mantenuta da componenti non-ionici, come il glucosio. Le cellule spermatiche di suino tollerano un range relativamente ampio di osmolarità che va dai 240 ai 380 mosM, ma sembra che i medium isotonici o leggermente ipertonici mantengano più efficacemente la capacità fecondante degli spermatozoi rispetto ai diluenti ipertonici (Weitze, 1990). Alcuni diluitori *long-term* (Androhep diluent, Zorlesco) contengono albumina sierica bovina (BSA) che stimola la motilità degli spermatozoi durante la conservazione (Waberski et al., 1989) e migliora la fertilità nel seme conservato per 3-5 giorni (Waberski et al., 1994a). Normalmente il rapporto seme-diluente non deve essere superiore a 1:10.

I cambiamenti strutturali e funzionali degli spermatozoi connessi alla conservazione allo stato liquido possono essere imputati, oltre che allo shock da freddo e alla diluizione, anche ad un naturale processo di invecchiamento determinato dalle condizioni e dalla durata della conservazione. L'invecchiamento degli spermatozoi avviene durante la conservazione *in vitro* e dopo l'inseminazione *in vivo* quando la popolazione di spermatozoi fertili aspetta l'ocita a livello della giunzione utero tubarica e della porzione caudale dell'istmo dell'ovidutto (sperm reservoir). I cambiamenti collegati al processo di invecchiamento possono riguardare i differenti compartimenti dello spermatozoo, come i mitocondri, il flagello, l'acrosoma, la membrana plasmatica e il DNA. Un'importante spia dei danni correlati all'invecchiamento degli spermatozoi durante la conservazione è la modificazione della permeabilità di membrana che è possibile evidenziare mediante un incremento dell'entrata di coloranti fluorescenti non permeabili all'interno delle cellule. Oltre

all'azione dannosa dei fattori legati alla conservazione a temperature di refrigerazione, la capacità fecondante del seme suino è fortemente influenzata dal fattore individuale. Le variazioni individuali sono determinate dalla diversa composizione chimica degli eiaculati, dalla qualità e la quantità del plasma seminale ma probabilmente anche dalle differenti proprietà intrinseche della membrana degli spermatozoi connesse significativamente alla sua funzionalità (Gadella et al., 1999). A causa dei danni subiti dalle cellule spermatiche durante la conservazione che vanno ad inficiarne la funzionalità e di conseguenza la capacità di fecondare l'oocita, prima di utilizzare il seme refrigerato è necessario farne una valutazione basata su parametri morfo-funzionali.

A tutt'oggi la motilità è il parametro qualitativo che viene più comunemente valutato associandolo alla fertilità in seguito alla conservazione. Infatti un calo della motilità solitamente è un indicatore della compromissione dell'attività metabolica anche se non implica necessariamente il danneggiamento della membrana plasmatica.

Molti autori hanno confermato un calo della motilità degli spermatozoi di suino proporzionale al tempo di conservazione. Kumaresan et al. (2009) e Gaczarzewicz et al. (2010) hanno registrato un decremento significativo della percentuale di cellule motili già dopo 24 h di conservazione; questa flessione sembra acuirsi all'aumentare delle ore di conservazione. De Ambrogi e collaboratori (2006a), utilizzando vari medium di diluizione, hanno invece evidenziato una diminuzione significativa della motilità degli spermatozoi di maiale solo dopo 72 di refrigerazione a 17°C.

Anche la valutazione della vitalità delle cellule spermatiche viene normalmente considerata come un dato predittivo della loro capacità fecondante. Gaczarzewicz e collaboratori (2010) hanno evidenziato, in seguito all'utilizzo di test diversi, un calo significativo della vitalità degli spermatozoi conservati a 17°C a partire dal terzo giorno di conservazione. Cerolini et al. (2000) hanno registrato una diminuzione significativa della percentuale di cellule spermatiche vive a partire dal secondo giorno di incubazione. Il danno di membrana può tradursi nella perdita dell'integrità acrosomiale, partendo dal presupposto che durante il periodo di conservazione

l'acrosoma è uno degli organelli più sensibili agli insulti. Molti autori hanno infatti dimostrato una progressiva diminuzione tempo-dipendente della percentuale di spermatozoi con acrosoma intatto durante la conservazione del seme suino (Kommisrud et al., 2002; De Ambrogi et al., 2006a; Waberski et al., 2006). La riduzione della percentuale di cellule con acrosoma intatto può essere causata, non solo dall'azione meccanica di danneggiamento di membrana, ma anche dalle modificazioni dell'architettura della membrana subite dagli spermatozoi durante la refrigerazione, che possono essere responsabili della conseguente reazione acrosomiale (Vishwanath e Shannon, 1997).

Poiché la conservazione allo stato liquido influisce negativamente prima sulla funzionalità degli spermatozoi compromettendo solo in un secondo tempo l'integrità della membrana plasmatica, è logico che le metodiche in grado di rilevare i danni subletali siano più sensibili rispetto ai test utilizzati per valutare l'integrità di membrana (Holt e Van Look 2004; Gillan et al., 2005; Petrunkina et al., 2007; Rodriguez-Martinez e Barth 2007). Abbiamo già visto come gli spermatozoi sottoposti all'azione congiunta degli stress legati alla conservazione rispondano con un'alterazione della struttura della membrana plasmatica. Diversi autori hanno ipotizzato e successivamente dimostrato come alcune delle modificazioni caratteristiche degli spermatozoi durante la conservazione siano paragonabili alle alterazioni subite dalle cellule spermatiche nel tratto genitale femminile ascrivibili al fisiologico processo di capacitazione; questi cambiamenti, classificati come simil capacitativi, in realtà sono responsabili della riduzione della capacità fecondante riscontrata nel seme conservato nonostante il mantenimento di percentuali accettabili di vitalità e motilità progressiva. La capacitazione consiste in una serie di eventi che implica numerosi cambiamenti fisiologici come l'alterazione della fluidità di membrana (Harrison, 1996), l'aumento della concentrazione ionica intracellulare (Adeoya-Osiguwa and Fraser, 1993) e l'upregulation dei pathway intracellulari (Kalab et al., 1998).

La comparsa di queste modificazioni durante il periodo di conservazione è stata valutata da molti ricercatori mediante l'utilizzo di metodiche che sfruttano i differenti markers di capacitazione: la variazione dell'affinità della membrana per il Ca^{++} evidenziata mediante la colorazione fluorescente CTC (clorotetraciclina) (Conejo-Nava et al., 2003; Dubè et al., 2004), la modificazione della fosforilazione delle proteine in tirosina (Dubè et al., 2004), i cambiamenti della fluidità di membrana mediante merocianina (MC) 540 e Annexina V (Waterhouse et al., 2004). Questi studi hanno dato risultati contrastanti soprattutto a causa dell'utilizzo di diverse temperature di conservazione e di diversi diluitori. Mentre Dubè e collaboratori (2004) hanno evidenziato un aumento della percentuale di spermatozoi capacitati durante la conservazione a 17°C utilizzando la colorazione CTC, l'aumento della fluorescenza della MC540, tipica delle membrane capacitate, non è stata registrata da Waterhouse et al. (2004). Durante la conservazione allo stato liquido gli spermatozoi di maiale a causa del loro alto contenuto in acidi grassi insaturi nei fosfolipidi di membrana, sono molto sensibili al danno provocato dalla perossidazione lipidica. L'eccessiva formazione di radicali dell'ossigeno (ROS), che rappresentano i prodotti derivanti dalle reazioni di perossidazione dei lipidi, sono stati associati con la diminuzione della funzionalità spermatica durante la conservazione (Chattejee e Gagnon, 2001). Il meccanismo attraverso il quale i ROS influenzano negativamente la funzionalità dello spermatozoo è multifattoriale. È stato ipotizzato che i ROS causino un rapido crollo della concentrazione intracellulare di ATP che precede la completa perdita di motilità da parte delle cellule spermatiche (De Lamirande e Gagnon, 1992). L'aumento della formazione dei radicali dell'ossigeno durante la conservazione allo stato liquido è stata dimostrata da Guthrie et al. (2008) mediante l'utilizzo del colorante lipofilo BODIPY, mentre nel 2009 Kumaresan e collaboratori (2009) hanno registrato un aumento della formazione di malonaldeide indicativo di un aumento della perossidazione lipidica. Gli stress provocati dalla diluizione e dalla conservazione sembrano indurre meccanismi simil-apoptotici. L'apoptosi è un fenomeno complesso che negli spermatozoi si manifesta con l'abbassamento del

potenziale mitocondriale transmembrana (Guthrie et al., 2008), con il crollo dell'attività mitocondriale (Fraser et al., 2002) e con modificazioni della permeabilità di membrana (Trzcinska et al., 2011). Kumaresan e coautori (2009) hanno dimostrato come durante la conservazione sia evidente sia un calo del potenziale mitocondriale transmembrana, che un aumento della permeabilità di membrana. Solo recentemente alcuni autori hanno iniziato a considerare l'integrità del DNA degli spermatozoi un parametro idoneo alla valutazione qualitativa degli eiaculati. Per quanto riguarda gli spermatozoi di suino è stato evidenziato un aumento progressivo della percentuale di cellule con DNA danneggiato durante la conservazione (Fraser e Strzezek, 2004; Boe-Hansen et al., 2008) che si manifesta con la riduzione della percentuale di gravidanze ottenute ma anche del numero dei suinetti/parto.

Incapsulazione degli spermatozoi

Negli ultimi anni sono state sviluppate diverse tecnologie per l'incapsulamento di cellule vive, animali o vegetali, con lo scopo di garantire all'interno della capsula l'ambiente fisiologico adatto alla loro sopravvivenza. Possiamo classificare le capsule in tre categorie: impermeabili, semipermeabili o permeabili, caratterizzate da differenti proprietà che ne stabiliscono il diverso utilizzo.

Il rilascio del contenuto delle capsule può avvenire in un periodo di tempo più o meno lungo ed il meccanismo coinvolto può essere il dissolvimento, l'erosione, la rottura o la digestione enzimatica della capsula.

Solitamente nelle biotecnologie mediche vengono utilizzate le membrane semipermeabili essendo barriere selettive che consentono il passaggio delle sostanze essenziali alla sopravvivenza delle cellule quali l'ossigeno e i nutrienti, ed impediscono contemporaneamente la penetrazione di molecole le cui dimensioni non ne permettono il passaggio attraverso i canali di membrana. Per scegliere la giusta tipologia di capsula bisogna innanzitutto considerare la biocompatibilità del materiale che si vuole utilizzare con le cellule ed i tessuti, ed inoltre fare in modo di ottenere

membrane con caratteristiche di permeabilità ideali per le cellule che si pongono all'interno della capsula stessa.

Lo sviluppo di questa tecnologia è stato incentivato dalla necessità di trapiantare cellule in un organismo vivente in maniera tale da mantenere l'integrità e la funzionalità cellulare e contemporaneamente evitare la somministrazione di farmaci immunosoppressori. Per riassumere l'intera procedura possiamo schematicamente dividere le tecniche di incapsulamento in due fasi: nella prima fase si ottengono gocce contenenti le cellule in soluzione acquosa, nella seconda invece si ha la formazione delle membrane semipermeabili mediante una reazione interfacciale.

Il principio di incapsulazione fu descritto per la prima volta da Chang nel 1957 e si basava sostanzialmente sull'utilizzo di due metodi: il primo basato sull'impiego di un'emulsione acqua/olio, alla quale viene aggiunta una soluzione di nitrocellulosa che precipita all'interfaccia dell'emulsione formando una membrana attorno alla goccia di fase acquosa. Il secondo metodo consiste nel deposito di uno strato di soluzione polimerica di nitrocellulosa sulla superficie di un liquido organico (paraffina liquida) a formare due strati; una soluzione acquosa, contenente il materiale biologico, è gocciolata sulla superficie del polimero, il quale si deposita attorno alla goccia e solidifica passando nella fase organica di paraffina liquida sottostante e formando una membrana di nitrocellulosa attorno al nucleo acquoso (Chang, 1998).

Negli anni successivi sono stati sviluppati numerosi metodi di microincapsulazione in laboratori indipendenti seguendo gli studi fatti da Chang. Lim e Sun (1980) furono i primi ad utilizzare l'alginato per l'incapsulazione; questi ricercatori impiegarono il biopolimero per incapsulare le isole di Langerhans, prevenendo in questo modo l'evenienza di rigetto in seguito al trapianto di cellule pancreatiche in topi affetti da diabete di tipo I.

Gli alginati sono una famiglia di polisaccaridi anionici lineari, non ramificati, ottenuti dalle alghe brune (*Phaeophyta*) e si trovano sia all'esterno che all'interno delle

cellule vegetali. Questi polimeri sono costituiti da monomeri di acido β -D-mannuronico (M) e α -L-guluronico (G) legati in posizione 1-4' e disposti a blocchi omopolimerici (GGG o MMM) o eteropolimerici (MGM). L'alginato è un polimero biocompatibile e biodegradabile che mima la matrice extracellulare e che supporta l'attività e il metabolismo delle cellule (George e Abraham, 2006). Queste caratteristiche hanno reso l'alginato il polimero ideale per la preparazione di capsule da utilizzare nelle culture tridimensionali di cellule mesenchimali (Ghidoni et al., 2008).

Il processo di incapsulazione ha suscitato interesse anche in campo riproduttivo.

L'incapsulazione degli spermatozoi è stata eseguita per la prima volta nella specie bovina da Nebel e collaboratori nel 1985. L'eiaculato dopo essere stato diluito in una soluzione fisiologica di alginato di sodio, è stato gocciolato, mediante l'impiego di un ago, in una soluzione acquosa di CaCl_2 ; immediatamente dopo il contatto, lo ione bivalente diffonde e reagisce con l'alginato che solidifica creando una matrice di gel contenente gli spermatozoi. Una volta ottenute le capsule queste vengono sospese in una soluzione fisiologica contenente poli-L-lisina che forma, per polimerizzazione interfacciale, una membrana semipermeabile attorno al nucleo. Per sciogliere la matrice di alginato contenuta nel nucleo bisogna adoperare una soluzione isotonica di citrato di sodio capace di chelare il calcio (Nebel et al., 1985).

L'impiego delle capsule nell'inseminazione artificiale ha garantito il mantenimento di elevate concentrazioni di spermatozoi nell'utero delle bovine durante l'estro, permettendo in questo modo un aumento della fertilità e delle gravidanze (Nebel et al., 1996). L'utilizzo delle capsule ha inoltre preservato gli spermatozoi dalla fagocitosi e prevenuto il reflusso di materiale seminale dalla cervice mediante bioadesione all'endometrio (Nebel et al., 1993).

Nel 1989 Van Blerkom ha incapsulato seme bovino impiegando un polimero non tossico (poliuretano-polietero) capace di liquefarsi alla temperatura corporea e gelificarsi alla temperatura di conservazione. Per ottenere queste capsule gli spermatozoi sono stati risospesi in una soluzione liquida del polimero a 37°C , versati

in appositi stampi e quindi sottoposti a raffreddamento fino alla temperatura di gelificazione del polimero. In questa tecnologia d'incapsulazione è molto importante valutare la concentrazione del polimero, infatti, una volta che le capsule vengono trasferite nel tratto riproduttivo femminile, deve essere garantita la dissoluzione del gel e la liberazione degli spermatozoi.

Nebel e Saacke (1996) impiegando la stessa tecnologia utilizzata da Nebel nel 1985 per incapsulare gli spermatozoi di bovino, hanno visto che le cellule spermatiche erano in grado di mantenere la vitalità per un tempo non superiore alle 16 ore a causa della loro sensibilità all'ossigeno, alla diluizione ed alla pressione (Nebel e Saacke, 1996). Per diminuire lo stress subito dagli spermatozoi, Torre e collaboratori hanno messo a punto (1998), una tecnologia di incapsulazione “*one-step*”: all'eiaculato vengono aggiunti cloruro di calcio e idrossipropilmetilcellulosa e la sospensione così ottenuta viene estrusa, mediante aghi, in una soluzione acquosa di alginato di sodio. Il calcio contenuto nella goccia diffonde nella soluzione di alginato e, reagendo con questo, forma una membrana di gel attorno al nucleo acquoso contenente gli spermatozoi (Torre et al., 1998) (Fig. 1).

Grazie allo sviluppo di questa tecnica, il seme suino riesce a mantenere un tempo di sopravvivenza di 100 ore. La motilità del seme risulta leggermente ridotta rispetto agli spermatozoi non incapsulati; tale fenomeno è probabilmente provocato dalla presenza dei residui di alginato in grado di “intrappolare” gli spermatozoi. Il valore di motilità è comunque accettabile se si considera la sensibilità del seme suino. Esiste una correlazione tra il peso e il volume delle capsule e la concentrazione di CaCl_2 utilizzata: l'aumento della concentrazione di calcio provoca l'incremento del peso e del volume delle capsule (Torre et al., 2000) e la diminuzione del diametro del nucleo (Villani et al., 2008).

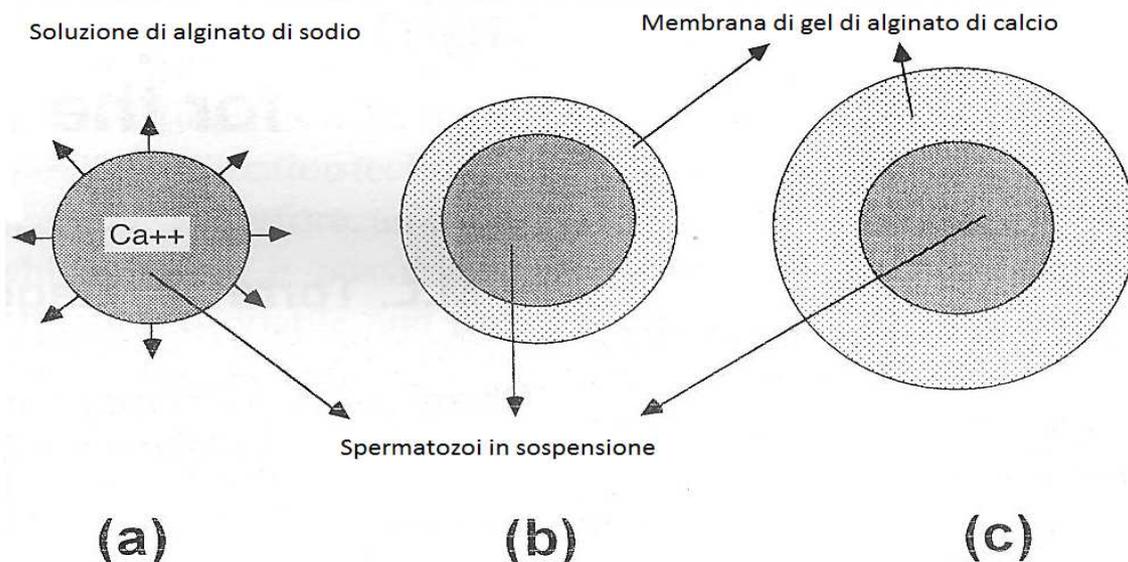


Fig. 1. Immagine rappresentativa del processo di formazione delle capsule di alginato di calcio: a) diffusione degli ioni calcio all'esterno della goccia; b) reazione tra ioni calcio e alginato di sodio; c) formazione della membrana di gel di alginato di calcio attorno al nucleo contenente la sospensione di spermatozoi. (Tratto da Torre et al., 1998, modificata)

Poiché il calcio favorisce la capacitazione del seme suino, si può supporre che questo metodo d'incapsulazione possa compromettere la capacità del seme incapsulato di fecondare l'ovocita. Vigo e collaboratori (2002a), considerando la capacità dello ione calcio di inibire la precoce capacitazione e prolungare la vitalità del seme, hanno dimostrato come il calcio cloruro possa essere impiegato come agente gelificante nel processo d'incapsulazione al posto del calcio cloruro. Il BaCl_2 , reagendo con l'alginato conferisce al gel una maggior resistenza, permettendo così di utilizzare anche concentrazioni più basse, rispetto a quelle utilizzate con CaCl_2 e di ridurre lo stress chimico sul seme.

L'impiego di queste capsule favorisce l'integrità acrosomiale che viene mantenuta più a lungo rispetto al seme refrigerato. A dimostrazione della miglior conservazione del seme incapsulato Faustini et al. (2004) hanno dimostrato una maggiore attività enzimatica intracellulare di citocromo ossidasi, lattato deidrogenasi e glucosio-6P-deidrogenasi negli spermatozoi incapsulati rispetto a quelli refrigerati.

Con questo metodo d'incapsulazione è possibile ottenere un altro tipo di capsule dette “*cross-linked*”; trattando le capsule di alginato di bario con una soluzione di protamina solfato all'1% (p/v), quest'ultima è capace di creare una reticolazione irreversibile sulla superficie esterna delle capsule (Vigo et al., 2002b). Le capsule “*cross-linked*” da una parte mantengono l'integrità acrosomiale degli spermatozoi ma dall'altra determinano un minor rilascio di materiale seminale rispetto alle altre capsule (Torre et al., 2002b).

Nel 2003 Chou e Wang hanno incapsulato seme suino in un sistema ottenuto per polimerizzazione di gocce di alginato di calcio. La messa a punto di questa metodica ha permesso di modulare lo spessore della membrana di gel e quindi di regolare la quantità di seme che viene liberata nel tempo.

Herrler et al., nel 2006, hanno valutato il comportamento del seme umano in microcapsule di alginato di calcio sottoposte a crioconservazione: dopo lo scongelamento gli spermatozoi hanno mostrato un'elevata vitalità ma una bassa motilità. Nonostante i bassi valori di motilità, questi spermatozoi possono essere utilizzati nella fecondazione *in vitro* mediante iniezione intracitoplasmatica di una sola cellula spermatica nella cellula uovo. Il successo ottenuto da questo gruppo di ricerca potrebbe risultare di estrema importanza per risolvere patologie umane che causano infertilità permettendo, al contempo, la conservazione di piccole quantità di spermatozoi isolati in seguito a biopsia dell'epididimo o del testicolo.

Nella specie suina la capacità fecondante degli spermatozoi incapsulati è stata valutata da Faustini et al. (2008), che, inseminando un gruppo di scrofe di controllo con trattamento convenzionale ed un secondo gruppo con un unico trattamento eseguito utilizzando capsule contenenti al massimo 5 miliardi di spermatozoi, hanno ottenuto un numero sovrapponibile di fecondazioni riuscite e di suinetti nati vivi; questo esperimento ha dimostrato come con un'unica somministrazione di seme contenuto in capsule a rilascio prolungato si possa ottenere una buona efficienza riproduttiva. La valutazione e il conseguente impiego di diversi diluitori,

eventualmente con composizione chimica modificata, costituisce una possibilità di sviluppo di questa tecnologia (Vigo et al., 2002b).

Il seme suino incapsulato è stato inoltre impiegato per migliorare la fertilizzazione *in vitro* degli oociti riducendo la frequenza della polispermia, che è da sempre il principale problema di questa tecnologia. A questo proposito è stato ipotizzato da Faustini et al. (2010) che la conservazione del seme all'interno delle capsule sia in grado di determinare un minor danno della membrana plasmatica degli spermatozoi preservando l'integrità dei ligandi specifici per i recettori presenti sull'oocita e quindi favorendo la corretta interazione tra i due gameti.

SESSAGGIO DEGLI SPERMATOZOI

La possibilità di predeterminare il sesso rappresenta da sempre uno degli obiettivi più ambiziosi ed importanti delle biotecnologie applicate alla riproduzione. Tuttavia, sebbene negli ultimi 20-30 anni il progresso delle biotecnologie riproduttive abbia raggiunto livelli tali da consentire di riprodurre *in vitro* tutte le fasi che caratterizzano il fisiologico processo di fecondazione, la predeterminazione del sesso non può ancora essere classificata tra gli obiettivi pienamente raggiunti dallo sviluppo tecnologico. L'applicazione del sessaggio negli allevamenti di animali in produzione zootecnica offre notevoli vantaggi economici. Il sesso dell'animale, oltre alle produzioni di genere (latte), influenza in modo consistente tutti i parametri produttivi, dagli incrementi ponderali, agli indici di conversione degli alimenti, alle caratteristiche delle carcasse. Nella specie bovina la produzione di animali di sesso predeterminato riveste una notevole importanza sia nell'industria del latte che nell'industria della carne. Infatti, la produzione di individui di sesso femminile di sicuro valore genetico porterebbe notevoli vantaggi negli allevamenti di vacche da latte, mentre la preselezione di animali di sesso maschile metterebbe a disposizione dell'allevatore carcasse con caratteristiche migliori per la produzione di carne. Anche nel caso del cavallo sportivo, la predeterminazione del sesso rappresenta uno

strumento di enorme rilevanza potenziale. Al di là dei programmi di riproduzione, per cui valgono le considerazioni precedentemente fatte, la possibilità di indirizzare la riproduzione verso un sesso o l'altro avrebbe ripercussioni per quanto riguarda le performance sportive degli animali, anche in rapporto alle diverse specialità.

La possibilità di predeterminare il sesso riveste un ulteriore interesse per le potenziali applicazioni nella lotta per salvaguardare specie animali in via di estinzione. Infatti, dove si può contare solo su di un numero ridotto di soggetti, un corretto programma di ripopolamento necessita di un rapporto maschi/femmine ottimale.

La preselezione di prole di sesso prestabilito potrebbe rivestire un ruolo chiave anche nel miglioramento della gestione riproduttiva nella specie suina. L'applicazione di queste tecnologie potrebbe rivelarsi molto utile per la produzione di linee femminili all'interno del nucleo riproduttivo. Inoltre se la produzione di individui di sesso femminile attraverso la preselezione fosse attuabile in maniera efficiente, si potrebbe rinunciare all'utilizzo della castrazione dei suinetti maschi come tecnica per prevenire il cosiddetto "odore di verro" dato dall'accumulo di feromoni maschili che rendono la carne del maiale maschio adulto non edibile. Il raggiungimento di questo obiettivo rivestirebbe una grandissima importanza soprattutto in Italia, paese in cui è molto diffuso l'allevamento del suino pesante che viene macellato al raggiungimento dei 150-160 kg e quindi in piena maturità sessuale. La possibilità di predeterminare il sesso, se si escludono le tecniche considerate ormai obsolete, si basa attualmente su due possibili approcci. La determinazione del sesso mediante PCR su blastomeri rimossi da embrioni preimpianto o la separazione degli spermatozoi con cromosoma X da quelli con cromosoma Y mediante citofluorimetria.

La valutazione degli embrioni preimpianto rappresenta un approccio che, anche se tecnicamente possibile e per il quale esiste un certo mercato nei programmi di trapianto embrionale, presenta problematiche di fondo che coinvolgono sia la sfera etica, quando l'embrione dal sesso indesiderato viene eliminato, sia quella

economica, derivante dagli elevati costi connessi con la pratica di superovulazione, il prelievo degli embrioni (effettuato chirurgicamente nel maiale), l'esecuzione della biopsia embrionale ed il successivo trapianto embrionale. La possibilità di predeterminare il sesso della progenie mediante separazione degli spermatozoi X e Y permetterebbe il superamento di tutte queste problematiche. La separazione degli spermatozoi aventi cromosoma maschile da quelli con cromosoma femminile si basa sul diverso quantitativo di DNA contenuto nel nucleo spermatico. La prima convincente e documentata differenza tra i cromosomi X e Y degli spermatozoi dei mammiferi fu ottenuta da Barlow e Vosa nel 1970: essi mostrarono una differente capacità di assorbimento di uno specifico colorante (quinacrina) da parte dei cromosomi sessuali umani.

Solo nel 1979 fu ipotizzato un possibile utilizzo della quantità di DNA come parametro per differenziare i cromosomi sessuali, in modo che gli spermatozoi X potessero essere separati dagli spermatozoi Y sulla base del maggior contenuto di DNA del cromosoma femminile (Moruzzi, 1979). Il sessaggio degli spermatozoi si basa sull'utilizzo della citometria a flusso associata a specifici metodi di colorazione del DNA che hanno permesso l'identificazione e quindi la separazione delle cellule con diverso contenuto di acido deossiribonucleico (Pinkel et al., 1982).

Per la colorazione del DNA di spermatozoi sono stati testati vari coloranti ma l'unico che permette la quantificazione citofluorimetrica del contenuto di DNA è l'Hoechst 33342 (Ho 33342). Il bisbenzimidazolo Hoechst 33342 (2''-(4-ethoxyfenolo)-5-(4-metil-1-piperazinolo)-2'',5''-bi-1H-benzimidazolo 3 HCl) è un colorante che penetra le membrane cellulari e colora selettivamente le paia di basi A-T lungo il solco minore del DNA. Il legame tra il DNA e l'Ho 33342 è stabilizzato da legami idrogeno, forze di Van der Waals e interazioni elettrostatiche. L'Ho 33342 potrebbe essere tossico ad alte dosi e per tale ragione esso deve essere usato prudentemente (Seidel e Garner, 2002); infatti sono state descritte mutazioni in cellule in attiva mitosi dopo l'esposizione all'Ho 33342 (Maxwell et al., 2004).

Tuttavia la nascita di milioni di bovini ma anche maiali, cavalli, pecore, conigli, delfini e altri mammiferi senza un aumento dell'incidenza di problemi fenotipicamente rilevabili rappresenta una chiara indicazione della scarsa tossicità dell'Ho 33342 sullo spermatozoo.

Le cellule morte o moribonde dopo colorazione con Ho 33342 possono essere identificate aggiungendo un colorante alimentare, il red food dye (FD & C40), che è in grado di evitare gli effetti potenzialmente mutageni dello ioduro di propidio utilizzato un tempo. Questo colorante alimentare agisce attenuando la fluorescenza dell'Ho 33342 dopo essere penetrato negli spermatozoi con la membrana danneggiata (Seidel e Garner, 2002). L'efficacia della separazione degli spermatozoi mediante citofluorimetro si basa sia sulla differenza di contenuto di DNA tra il cromosoma X e Y che sulla forma della testa dello spermatozoo. Convenzionalmente, una separazione caratterizzata da elevati livelli di purezza al citofluorimetro può essere ottenuta solo quando il contenuto di DNA differisce più del 3,5% (Johnson, 2000).

La maggior parte dei mammiferi domestici è caratterizzata da spermatozoi con testa ovale e appiattita che tendono a essere più facilmente orientati rispetto al raggio laser dello sperm sorter rispetto a quei gameti che possiedono delle teste con forma più irregolare e rotonde.

Il sessaggio degli spermatozoi sulla base del contenuto di DNA viene quindi effettuato mediante lo sperm sorter, il quale incorpora gli aspetti analitici della citometria a flusso con la capacità di sortaggio (Johnson e Pinkel, 1986). Il cell-sorter adeguatamente modificato per poter lavorare con gli spermatozoi fu sviluppato nel 1970 (Johnson et al., 2005).

Mentre la Tecnologia di Sessaggio degli Spermatozoi di Beltsville è stata realizzata e sviluppata solo a partire dalla fine degli anni '80 (Johnson, 1991).

Gli sperm sorter rientrano in due categorie:

- quelli di prima generazione o i sistemi standard veloci, dove i campioni sono sortati sotto una pressione di $0,84 \text{ Kg/cm}^2$ e possono essere sortati circa 350000 spermatozoi/h;

- quelli di seconda generazione o cell-sorter ad alta velocità (sul mercato dal 1996) che trattano il campione a pressioni da $0,84 \text{ Kg/cm}^2$ a $4,22 \text{ Kg/cm}^2$ (Johnson, 2000). Questo sistema di sortaggio modificato per gli spermatozoi può produrre 8-10 milioni di spermatozoi X e Y all'ora (Johnson et al., 2005).

Il sistema ad alta velocità permette di selezionare le cellule a una pressione e una velocità più alta, fino a 40000 eventi/sec, rispetto al sistema a velocità standard che può solo raggiungere un massimo di 10000 eventi/sec.

Lo sperm sorter è composto da un'area nella quale viene introdotto il campione, da un laser ultravioletto, da un'area di sortaggio, da un congegno per il controllo della pressione, da una torre elettronica per modificare i parametri durante il sortaggio e da un computer per l'elaborazione dei dati. All'interno dell'area di sortaggio si trovano un Cytonozzle con una punta orientante e due fotomoltiplicatori, uno a 180° rispetto al raggio del laser (forward) ed uno a 90° (side). Sempre all'interno dell'area di sortaggio esiste un sistema che blocca l'eventuale fuoriuscita di luce incidente del laser proteggendo così l'operatore (Seidel e Gardner, 2002).

Il "cuore" del sorter è quindi rappresentato dal piezo-nozzle che è conformato come un imbuto all'interno del quale viene immesso lo sheat fluid, liquido diverso a seconda della specie che dovrà proteggere gli spermatozoi durante le fasi successive della procedura. Centralmente al flusso di sheat fluid che si viene a formare vengono iniettati gli spermatozoi testa-coda; quindi il flusso che fuoriesce dal nozzle sarà costituito al centro dagli spermatozoi e da una sorta di guaina esterna di sheat fluid. Il laser colpisce gli spermatozoi alla loro fuoriuscita dal nozzle e la fluorescenza emessa verrà rilevata dai due fotomoltiplicatori: quello a 90° (side) e quello a 180° (forward), cioè nella direzione del raggio del laser. L'intensità della fluorescenza emessa è minore sulla faccia appiattita che deve essere quindi ben orientata rispetto il fotomoltiplicatore forward, cioè nella direzione del raggio del laser.

Un orientamento adeguato della faccia piatta dello spermatozoo permette un'accurata discriminazione della fluorescenza emessa dagli spermatozoi X e Y, quindi solo gli spermatozoi ben orientati potranno essere sortati. Il secondo fotomoltiplicatore, quello a 90° rispetto al raggio del laser, è utilizzato per valutare l'adeguato orientamento degli spermatozoi. Il segnale fluorescente sarà più alto quando gli spermatozoi sono orientati in modo di avere il loro margine verso il fotomoltiplicatore a 90° . Quindi, solo questi spermatozoi che emetteranno un picco di fluorescenza a 90° sono considerati adeguatamente orientati e avranno la loro faccia piatta verso il fotomoltiplicatore forward. Una volta misurata l'intensità della fluorescenza dai fotomoltiplicatori, il piezo-nozzle vibrando spezza il flusso in tante goccioline. Se uno spermatozoo viene riconosciuto come spermatozoo X adeguatamente orientato, la goccia che lo contiene verrà caricata negativamente, la goccia contenente gli spermatozoi Y ben orientati sarà invece caricata positivamente. Quando queste gocce passano attraverso un campo elettrico di 3000 volt vengono attratte verso la piastra di segno opposto. Si ha così la deflessione delle gocce contenenti gli spermatozoi X e Y in due tubi di raccolta separati. Gli spermatozoi morti che presentano un calo della fluorescenza che viene smorzata dal FD&C40 e gli spermatozoi non adeguatamente orientati si trovano in gocce che non vengono caricate elettricamente e quindi finiscono perpendicolarmente in una raccolta degli spermatozoi di scarto.

Il sessaggio di tutti gli spermatozoi non umani viene effettuato grazie a high speed sperm sorter (MoFlo, Dako Cytomation), equipaggiati con argon laser, due fotomoltiplicatori e da uno speciale kit orientante modificato da Rens et al. (1998-1999). Gli sperm-sorter di ultima generazione si avvalgono non più di argon laser ma di laser a stato solido che permettono una notevole riduzione del rumore di fondo ed una più facile identificazione dagli spermatozoi portatori della X e della Y (Sharpe e Evans, 2009).

Una volta terminato il sortaggio gli spermatozoi sono centrifugati (300-700 x g) e concentrati. Gli spermatozoi sortati vengono quindi raccolti dentro i tubi di polipropilene da 15 ml contenenti 500 µl di TEST-yolk (2-20%) .

Quando gli spermatozoi sono utilizzati per la fecondazione in vitro per produrre embrioni sessati, la percentuale di tuorlo d'uovo può essere ridotta a meno del 5% (anche 2%) per evitare interferenze con la fertilizzazione. Questo additivo serve per proteggere gli spermatozoi dagli effetti combinati della diluizione e dai danni fisici provocati dalla proiezione dentro il tubo di raccolta. Maxwell et al. (1996) furono i primi ad aggiungere il plasma seminale eterologo (10%) il quale ha effettivamente ridotto la percentuale di spermatozoi che mostrano la reazione acrosomiale dopo il sortaggio.

I limiti all'applicazione commerciale del sessaggio degli spermatozoi di verro sono legati a diversi fattori: le caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'apparato riproduttivo femminile della scrofa, la produzione in un arco di tempo eccessivamente lungo di bassi quantitativi di spermatozoi rispetto al numero necessario per l'inseminazione artificiale e il calo della qualità degli spermatozoi a causa dei danni provocati dall'intero processo di sessaggio. Gli spermatozoi durante il processo di sperm sorting vengono sottoposti a vari stress di tipo chimico, fisico ed elettrico.

Inoltre, la sensibilità dei gameti maschili ai diversi step del sex-sorting e l'effetto sugli spermatozoi dei protocolli di lavorazione post-sessaggio, sono maggiori nella specie suina rispetto ad altre specie come il bovino e l'ariete (Maxwell et al., 1998). Queste manipolazioni si combinano allo stress indotto nelle cellule spermatiche, riducendo la loro vitalità, la loro capacità di conservazione e la loro capacità fecondante dopo il *sorting* (Parrilla et al., 2005). Contemporaneamente allo sviluppo di questa tecnologia sono stati portati avanti molti studi con lo scopo di identificare quali dei numerosi step previsti dalla procedura di sortaggio sono maggiormente responsabili dell'effetto dannoso del sex sorting sugli spermatozoi di verro. Vasquez et al. (2002) hanno testato l'effetto della colorazione con l'Hoechst

33342 sulla capacità fecondante in vitro delle cellule spermatiche di maiale. Gli spermatozoi colorati con l'Hoechst 33342 hanno mostrato tassi di fecondazione uguali a quelli raggiunti mediante l'utilizzo di spermatozoi non sottoposti a colorazione. Infatti, non essendo l'Hoechst 33342 un agente intercalante e possedendo la cellula spermatica la cromatina molto compattata che protegge il DNA da differenti tipi di insulti, è possibile che questo colorante da solo non possa influenzare in maniera negativa la capacità fecondante degli spermatozoi di verro se utilizzato alle concentrazioni utilizzate per il sessaggio. Un altro fattore che è stato identificato come potenziale responsabile del calo della fertilità dopo IA con seme sessato, è l'impatto del raggio laser UV durante la procedura di sessaggio. Guthrie et al. (2002) hanno testato l'effetto di laser di differente potenza sulla capacità di sviluppo di embrioni prodotti in vivo mediante l'utilizzo di seme suino sortato e non sortato. L'uso di un raggio laser a bassa potenza non ha apportato un miglioramento ai tassi di fecondazione e sviluppo embrionale.

Gardner nel 2001 ha effettuato uno studio sui danni al DNA degli spermatozoi e sulla vitalità degli spermatozoi in seguito a varie combinazioni di fattori stressanti tipici dello sperm sorter come ad esempio: la pressione di 50 psi, l'esposizione al raggio del laser, le procedure di colorazione e ha osservato che i maggiori danni derivano dagli stress di tipo fisico e meccanico. Questi risultati sono in accordo con quanto è stato osservato recentemente da De Ambrogi et al. (2006b) che hanno evidenziato che per quanto riguarda l'integrità del DNA e della membrana degli spermatozoi sessati, il fattore critico è lo stress pressorio durante il sorting. Bisogna quindi mantenere bassa la pressione in modo da ridurre i danni di tipo meccanico senza però ridurre troppo la velocità del processo di sorting. Per effettuare un sortaggio degli spermatozoi con il MoFlo e per avere delle popolazioni altamente pure, cioè accettabili da un punto di vista commerciale, gli spermatozoi fino a qualche anno fa venivano accelerati fino a una velocità di 90 Km/h sottoponendoli a una pressione di 50 psi. Riducendo la pressione si riducono i danni agli spermatozoi ma si è visto che non ci sono più effetti benefici se si riduce la pressione al di sotto di 31 psi. Si deve comunque considerare

che riducendo la pressione si minimizzano i danni agli spermatozoi, ma questa bassa pressione può non essere sufficiente ad orientare adeguatamente quegli spermatozoi che sono caratterizzati da teste molto rotondeggianti e poco appiattite come avviene nel gatto, cane, cavallo e uomo.

Al termine dell'intera procedura di sessaggio, inoltre, gli spermatozoi di verro vengono diluiti più di ventimila volte (Vazquez et al., 2009). Il forte tasso di diluizione è stato identificato come uno dei maggiori svantaggi della tecnologia del *sex sorting* (Maxwell et al., 1996). Questa estrema diluizione corrisponde alla diluizione dei fattori decapacitanti presenti nel plasma seminale, e quindi alla precoce induzione di cambiamenti "simil-capacitativi" che portano alla reazione acrosomiale con conseguente morte cellulare e perdita della capacità fecondante (Caballero et al., 2004; Spinaci et al., 2006). A questo punto gli spermatozoi sessati diluiti devono essere riconcentrati prima dell'inseminazione, di solito mediante l'utilizzo della centrifugazione. La centrifugazione costituisce un evento stressante per gli spermatozoi di verro a causa dell'effetto diretto sulla membrana plasmatica (Carvajal et al., 2004). Per questo motivo sono stati valutati metodi alternativi per concentrare gli spermatozoi in seguito al sessaggio. Garcia et al. (2007) hanno registrato un miglioramento della capacità fecondante in vitro degli spermatozoi di verro lasciati sedimentare sul fondo piuttosto che sottoposti a centrifugazione.

DANNI POST-SORTING E CONSERVAZIONE DEL SEME SESSATO DI MAIALE

I maggiori stress per gli spermatozoi di verro durante la procedura di sortaggio derivano da: gli alti tassi di diluizione utilizzati, i cambiamenti della pressione idrodinamica e le forze di orientamento all'interno del flusso del citofluorimetro, i cambiamenti di temperatura, il passaggio attraverso un raggio laser molto potente, la brusca formazione di gocce mediante la vibrazione meccanica del cristallo piezoelettrico, il caricamento elettrico delle gocce ed infine la deviazione ad alta

velocità verso i tubi di raccolta (Leahy e Gadella, 2011). Gli effetti dannosi di tutte queste procedure si possono raggruppare in: danni all'integrità di membrana, modificazioni simil-capacitative (Maxwell e Johnson, 1997; Spinaci et al., 2006), ridotto tasso di concepimento e possibile aumento delle perdite in gravidanza (Bathgate, 2008).

Maxwell et al. (1996) e Maxwell e Johnson (1997) hanno dimostrato che sia la vitalità che l'integrità di membrana degli spermatozoi di maiale vengono compromessi dal flow sorting. Inoltre, secondo Spinaci et al. (2005), le cellule spermatiche subiscono un calo della vitalità già in seguito al periodo di incubazione con il colorante Hoechst 33342.

L'evidenza dei cambiamenti simil-capacitativi non costituisce una evenienza inattesa considerando i passaggi previsti dalla procedura di sortaggio. In specifico, i campioni vengono diluiti a livelli estremi ed esposti a forze meccaniche, numerosi diluenti e potenziali agenti capacitanti (es. albumina sierica bovina). La combinazione di questi fattori potrebbe indurre la rimozione dagli spermatozoi del materiale extracellulare (Caballero et al., 2009), tra cui i fattori stabilizzanti la membrana plasmatica, responsabile della conseguente maggior vulnerabilità della cellula agli altri passaggi stressanti previsti dalla procedura di sortaggio. Numerosi sono gli studi effettuati allo scopo di identificare le modificazioni sia di membrana che funzionali a carico degli spermatozoi di maiale sortati.

Parrilla et al. (2004) hanno dimostrato, analizzando gli spermatozoi di verro sortati mediante l'utilizzo del sistema CASA (computer-assisted-sperm-analysis), un aumento della percentuale di spermatozoi con pattern di motilità iperattivata presente solitamente all'inizio della capacitazione.

Allo scopo di evidenziare eventuali cambiamenti capacitativi degli spermatozoi sortati è stata anche utilizzata la colorazione fluorescente CTC. Il CTC (Clortetraciclina) è un antibiotico capace di entrare all'interno della cellula nei compartimenti con alti livelli di calcio libero e di diventare più fluorescente in seguito

al suo legame con il calcio (Tsien, 1989). I complessi CTC-Ca²⁺ si legano preferenzialmente alle regioni idrofobiche della membrana cellulare mostrando localizzazioni e quindi pattern diversi nei differenti momenti funzionali della cellula spermatica. Secondo uno studio effettuato da Maxwell e Johnson (1997), la procedura di sortaggio è in grado di provocare un aumento significativo della percentuale di spermatozoi che mostrano un pattern di fluorescenza simile a quello presente nella maggior parte delle cellule spermatiche sottoposte a capacitazione. Le cellule di mammifero rispondono allo stress ambientale mediante la sintesi di una famiglia di proteine conosciute come proteine da shock termico (heat shock protein, HSP). Gli spermatozoi, che sono cellule estremamente specializzate, sono state ritenute trascrizionalmente inattive e prive dell'apparato necessario per la neosintesi proteica all'interno del residuo citoplasmatico. Per questo motivo gli spermatozoi non possono rispondere agli stress cui sono sottoposti aumentando l'espressione delle HSP ma possono consumare solo la quantità di proteine già sintetizzate. Essendo la procedura del sortaggio molto stressante per la cellula spermatica, Spinaci et al. (2006) hanno voluto verificare se in seguito a ciascuno degli step previsti dalla procedura di sortaggio possono essere evidenziati eventuali modificazioni o rilocalizzazioni dell'Hsp60, Hsp70 e Hsp90. Mentre l'Hsp60 e 90 non hanno mostrato alcuna modificazione né della loro quantità né della loro distribuzione, un aumento degli spermatozoi presentanti il pattern tipico delle cellule capacitate è stato rilevato sin dall'incubazione degli spermatozoi con Hoechst 33342, prima del passaggio attraverso il citofluorimetro.

Questo dato è molto importante, non solo perché viene confermato il verificarsi delle modificazioni capacitative fin dalle prime fasi del sortaggio, ma anche perché è stato ipotizzato un ruolo attivo dell'Hsp70 nel processo della fecondazione (Bohring e Krause, 2003).

La fosforilazione dei residui di tirosina delle proteine ed anche il rimodellamento e la polimerizzazione dell'actina presente nel citoscheletro sono due eventi che

caratterizzano la capacitazione degli spermatozoi di verro (Satorre et al., 2009; Brener et al., 2003). Per questo motivo Bucci et al. (2011) hanno considerato l'analisi di questi due fenomeni, parametri idonei a verificare se la procedura di sortaggio induca sulle cellule spermatiche modificazioni strutturali e funzionali tipiche del fisiologico processo di capacitazione. I risultati di questa ricerca hanno dimostrato che, mentre la riorganizzazione dell'actina presente nel citoscheletro viene in parte influenzata dalla procedura di sortaggio, il grado di fosforilazione dei residui di tirosina non sembra essere condizionato dagli stress subiti durante il sorting. Questi dati possono farci riflettere sulla vera natura delle modificazioni indotte dal sex-sorting. Infatti, mentre le modificazioni di membrana, analizzate mediante la colorazione CTC e l'immunolocalizzazione dell'Hsp70, cambiano durante la procedura di sessaggio assumendo pattern presenti nelle cellule capacitate, il grado e la localizzazione dei residui di tirosina fosforilati, che costituiscono un vero e proprio cambiamento funzionale, non sono influenzati dal sorting. Per questo motivo Bucci et al. (2011) hanno ipotizzato che gli spermatozoi sortati di suino mostrino precoci modificazioni simil-capacitative ma non una vera attivazione dei pathway funzionali.

Alcuni autori hanno anche vagliato l'ipotesi che la colorazione, il passaggio attraverso il citofluorimetro e la centrifugazione successiva possano attivare dei pathway dell'apoptosi. Spinaci et al. (2005), hanno valutato, mediante l'utilizzo dell'Annessina V legata ad un fluoroforo, l'eventuale esterificazione della fosfatidilserina a livello della membrana plasmatica delle cellule spermatiche sottoposte a *sorting*. Questo cambiamento a carico della membrana plasmatica cellulare è indicativo di un'alterazione della distribuzione dei fosfolipidi nei due strati lipidici che nelle cellule somatiche ha luogo durante la fase esecutiva del fenomeno apoptotico, mentre negli spermatozoi è da alcuni considerato un fenomeno strettamente correlato allo scrambling fosfolipidico tipico del processo di capacitazione (Gadella and Harrison, 2002).

In questo studio, sottoponendo gli spermatozoi sortati alla colorazione con Annessina V, Spinaci et al. (2005) non hanno evidenziato un aumento delle cellule Annessina positive e quindi con fosfatidilserina esterificata.

Un metodo utilizzato invece per valutare l'innescamento della cascata apoptotica può essere considerata la stima del grado di frammentazione del DNA degli spermatozoi dopo il processo di sortaggio. Con questo fine De Ambrogi et al. (2006b) hanno dimostrato come gli spermatozoi sortati in realtà sembrano non mostrare un aumento significativo della percentuale di cellule con DNA frammentato. Bisogna però sottolineare come le cellule con DNA già frammentato vengano eliminate durante il passaggio attraverso il citofuorimetro; infatti gli spermatozoi sottoposti all'azione meccanica e all'alta pressione senza essere sottoposti al laser, e quindi non sortati, mostrano un aumento dell'indice di frammentazione del DNA.

Una volta identificate le modificazioni a carico della cellula spermatica causate dalla procedura di sortaggio, molti autori hanno voluto valutare l'effetto di queste alterazioni sulla capacità fecondante degli spermatozoi. Maxwell et al. (1998) hanno osservato come la percentuale di oociti penetrati e divisi è più alta quando vengono fecondati con spermatozoi sortati piuttosto che con spermatozoi di controllo, confermando l'attivazione funzionale del processo di capacitazione nelle cellule spermatiche post *sorting*. D'altra parte Spinaci et al. (2005) non hanno registrato cambiamenti significativi della percentuale di blastocisti ottenute dal seme sortato rispetto a quella raggiunta utilizzando il seme di controllo.

Altri studi (Rath et al., 2003; Grossfeld et al. 2005) fatti in vivo, hanno inoltre dimostrato come gli spermatozoi di verro sortati possono essere utilizzati con successo per la produzione di suinetti mediante inseminazione artificiale, anche se con tassi di gravidanza inferiori rispetto a quelli raggiunti mediante l'utilizzo di seme di controllo.

Poiché uno dei fattori responsabili delle modificazioni simil-capacitative a carico della cellula spermatica post-*sorting* è l'allontanamento delle sostanze decapacitanti

presenti nel plasma seminale a causa dell'estrema diluizione, molti autori hanno testato l'effetto dell'aggiunta del plasma seminale sulle caratteristiche morfo-fisiologiche degli spermatozoi di verro sortati. È stato osservato in molti studi come il plasma seminale, addizionato ai campioni subito dopo il sortaggio, sia capace di migliorare la funzionalità (vitalità e stato capacitativo) degli spermatozoi di maiale (Maxwell et al., 1998; Caballero et al., 2008). Parilla e collaboratori (2005) hanno inoltre dimostrato come gli spermatozoi sortati incubati con plasma seminale almeno per due ore, mostrino i parametri di motilità simili a quelli ottenuti nei campioni non sortati, ritornando alla motilità non-iperattivata e in questo modo allungando la sopravvivenza degli spermatozoi sortati. Anche Spinaci et al. (2006) hanno dimostrato che l'aggiunta del plasma seminale post *sorting*, è in grado di indurre un ritorno al pattern di localizzazione dell'Hsp70 caratteristico delle cellule spermatiche non sortate.

L'azione decapacitante del plasma seminale è stata ulteriormente provata da Maxwell et al. (1998) i quali hanno osservato che, utilizzando per la fecondazione spermatozoi sortati di verro sottoposti all'azione del plasma seminale sia nel diluente che nel medium di raccolta, la percentuale di oociti fecondati penetrati e divisi è risultata inferiore a quelle che si ottengono in seguito all'uso di spermatozoi di controllo o sessati senza l'aggiunta di plasma seminale. Risultati simili sono stati ottenuti quando sono state addizionate al medium di raccolta degli spermatozoi sortati, le spermadesine eterodimeri PSP-I/PSP-II, estratte dal plasma seminale di maiale (Centuriòn et al., 2003; Garcia et al., 2006). L'uso di queste proteine isolate ha il vantaggio di evitare la variabilità del contenuto proteico all'interno del plasma seminale. Gli eterodimeri sembrano preservare l'integrità di membrana, la motilità e l'attività mitocondriale degli spermatozoi altamente diluiti. Questo fenomeno sembra sia correlato alla loro capacità di aderire al dominio acrosomiale, esercitando un effetto stabilizzante sulla fluidità della membrana plasmatica e forse un ruolo decapacitante (Caballero et al. 2006, 2008).

La ridotta sopravvivenza degli spermatozoi sortati costituisce il punto critico nell'applicazione delle tecnologia del *sex-sorting* alla produzione zootecnica, soprattutto per la distanza tra le stalle e i centri di produzione di seme sessato (Vazquez et al., 2008). Le modalità di conservazione delle cellule spermatiche sortate sono sostanzialmente due e cioè la conservazione allo stato liquido e la crioconservazione. A tutt'oggi la conservazione allo stato liquido viene ritenuta necessaria, considerando che attualmente il quantitativo di seme sortato prodotto mediante strumenti di ultima generazione non è ancora sufficiente ad effettuare un'inseminazione profonda. Per questo motivo è importante determinare come il tempo di conservazione possa influenzare la qualità e la capacità fecondante degli spermatozoi sortati. Parilla et al. (2005) hanno osservato come la motilità e l'integrità di membrana siano diminuite in maniera significativa solo dopo 10 h di conservazione a 20°C rispetto agli spermatozoi di controllo, mentre l'integrità acrosomiale delle cellule spermatiche, che ha subito un calo subito dopo la procedura di sortaggio, ha mantenuto valori simili a quelli post *sorting* durante le 10 h di conservazione. Gli stessi autori (Parilla et al., 2005) hanno inoltre osservato che la capacità fecondante degli spermatozoi di verro sortati viene mantenuta solo per un breve arco temporale (inferiore a 5 ore). Nel tentativo di minimizzare gli effetti dannosi della diluizione e del processo di concentrazione degli spermatozoi post-*sorting*, García et al. (2007) hanno testato l'effetto dell'aggiunta delle spermadesine PSP-I/PSPII o del plasma seminale, e dell'utilizzo della centrifugazione o della sedimentazione post *sorting*, sui parametri qualitativi e sulla capacità fecondante delle cellule spermatiche sortate conservate per 18 ore. I risultati di questo lavoro hanno evidenziato come in realtà la presenza del plasma seminale e delle spermadesine non influenzino i parametri qualitativi, e come invece l'utilizzo della sedimentazione, invece della centrifugazione, induca un miglioramento della caratteristiche morfo-funzionali delle cellule spermatiche. Per quanto riguarda la capacità fecondante invece, hanno osservato come la sedimentazione dei campioni in

presenza delle spermadesine, sia in grado di incrementare la capacità fecondante degli spermatozoi di verro sortati dopo 18 ore di conservazione.

Un altro modo per bypassare l'ostacolo rappresentato dal numero limitato di spermatozoi prodotti mediante *sex sorting*, potrebbe essere la crioconservazione dei gameti maschili che permette la creazione di una banca di spermatozoi sessati congelati.

La crioconservazione sarebbe inoltre utile per conservare il seme a lungo termine e per trasportarlo senza problemi anche a lunghe distanze. Sfortunatamente, le procedure di congelamento-scongelamento compromettono la qualità del materiale seminale, il che implica un necessario incremento del numero degli spermatozoi sortati che vanno a costituire una dose per IA (Bathgate et al., 2008). In aggiunta, come abbiamo già visto, anche la procedura di sortaggio conferisce alle cellule spermatiche una serie di modificazioni in grado di diminuire la loro longevità rispetto a quella delle cellule non sortate. Questo calo della longevità spermatica è in grado di esacerbare l'invecchiamento artificiale degli spermatozoi osservato durante il congelamento-scongelamento (Watson, 1995). In alternativa, il sortaggio potrebbe anche compromettere la criosopravvivenza in seguito a selezione di spermatozoi con membrane presentanti specifiche composizioni lipidiche (es. alterazione della riorganizzazione lipidica o dei rapporti lipidici) (Bathgate et al., 2008). Finora, ci sono pochi lavori in cui è stata testata la capacità fecondante degli spermatozoi di suino sortati e congelati. Johnson et al. (2000a) sono stati in grado di ottenere la nascita di due suinetti, in seguito a inseminazione laparoscopica, utilizzando seme sortato e congelato. Hanno stimato che circa il 30% delle cellule spermatiche sono state in grado di sopravvivere alle procedure di sessaggio e congelamento valutandone la motilità post-scongelamento. Anche Bathgate et al. (2008) inseminando in vivo le scrofe con seme sortato-congelato hanno ottenuto una percentuale di gravidanza simili a quella raggiunta mediante l'utilizzo di seme non sortato. Ad ogni modo, le scrofe inseminate con seme sessato e congelato sono

ritornate in estro dopo 57 giorni dall'inseminazione, dimostrando una percentuale maggiore di aborti precoci in gravidanza rispetto alle scrofe inseminate con il seme di controllo. Gli autori di questo lavoro (Bathgate et al., 2008) hanno quindi ipotizzato che, a monte di questo aumento della percentuale di aborti nella fase iniziale della gravidanza ci siano stati sia il basso numero di spermatozoi utilizzato che la compromissione della capacità di sviluppo degli embrioni derivanti dagli spermatozoi sortati e congelati.

UTILIZZO DI ANTIOSSIDANTI NELLA CONSERVAZIONE DEL SEME SORTATO

Lo spermatozoo è una cellula fortemente specializzata dotata della capacità di muoversi attivamente e fecondare l'oocita ma qualunque danno alla sua membrana plasmatica porta alla perdita irreversibile della sua funzionalità. L'integrità della cellula spermatica può essere pregiudicata dall'azione di molti agenti pericolosi, ma il danno ossidativo indotto dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) rappresenta uno degli stress più deleteri a cui queste cellule possono essere sottoposte. I ROS sono forme parzialmente ridotte dell'ossigeno atmosferico (O_2) e originano dall'eccitazione dell' O_2 a formare l'ossigeno singoletto (O_2^1) o dal trasferimento di uno, due o tre elettroni all' O_2 per formare, rispettivamente, un anione superossido (O_2^-), un perossido di idrogeno (H_2O_2) e un radicale idrossilico (OH). Al contrario dell' O_2 atmosferico, i ROS possono provocare illimitata ossidazione dei vari componenti cellulari, portando alla distruzione cellulare radicale-mediata (Drevet, 2006).

La suscettibilità degli spermatozoi allo stress ossidativo deriva primariamente dall'abbondanza di acidi grassi insaturi presenti nella membrana plasmatica. Questi acidi grassi insaturi danno alla membrana plasmatica degli spermatozoi la fluidità necessaria per aumentare la sua capacità fusogonica durante la reazione acrosomiale e

l'interazione spermatozoo-oocita. La natura insatura di queste molecole le predispone all'attacco da parte dei radicali liberi e di conseguenza alla continua perossidazione lipidica a carico della membrana plasmatica. Una volta che questa reazione viene innescata, si verifica l'accumulo dei perossidi lipidici sulla superficie dello spermatozoo a cui può far seguito un danno ossidativo alle proteine e al DNA.

Allo scopo di contrastare l'effetto dannoso dei ROS, tutte le cellule dell'organismo e quindi anche le cellule spermatiche sono dotate di varie molecole non-enzimatiche (come il glutatione, molecole contenenti tiolo come le vitamine D, E e C) e molti altri piccoli metaboliti. A completare l'apparato antiossidante, sono presenti enzimi specifici in grado di contrastare l'azione dei ROS (ROS scavenger) come la superossido dismutasi, la catalasi e la glutazione perossidasi che lavorano in stretta collaborazione. La superossido dismutasi (SOD) catalizza la dismutazione dell'anione superossido (O_2^-) in perossido di idrogeno (H_2O_2) e ossigeno molecolare. Per riciclare in maniera efficiente il perossido di idrogeno (H_2O_2) sono a disposizione della cellula l'attività enzimatica della catalasi e della glutazione perossidasi. Infatti entrambi gli enzimi sono in grado di trasformare il perossido di idrogeno in un prodotto innocuo, cioè in H_2O . In seguito a vari studi i ricercatori sono stati in grado di identificare nel plasma seminale e negli spermatozoi la presenza dell'enzima SOD (uomo: Alvarez et al., 1987; maiale: Kowalowka et al., 2008), della catalasi (uomo: Jeulin et al., 1989), del sistema glutazione perossidasi/riduttasi (uomo, topo, coniglio: Alvarez e Storey, 1989; maiale: Jelezarsky et al., 2007) e anche di una grande varietà di sostanze con attività SOD o catalasi-simili (uomo: Zini et al., 1993) come l'a-tocoferolo, l'acido ascorbico, il glutatione (Halliwell e Gutteridge, 1989; maiale: Strzezek, 2002), il piruvato (uomo: de Lamirande e Gagnon, 1992), la taurina, l'ipotaurina e l'albumina (coniglio: Alvarez e Storey, 1983). La presenza di queste sostanze con attività antiossidante normalmente fa in modo di mantenere un equilibrio tra la quantità di ROS prodotti e quelli eliminati ma quando la produzione delle specie reattive dell'ossigeno supera le difese degli antiossidanti naturali, possono verificarsi alterazioni della struttura della cellula spermatica.

La manipolazione degli spermatozoi, come il raffreddamento, la conservazione a lungo termine e il congelamento possono provocare l'aumento della perossidazione lipidica, che porta all'ossidazione delle proteine, alla frammentazione del DNA (Bennetts e Aitken, 2005) e alla riduzione della motilità spermatica (Guthie e Welch, 2006). Negli ultimi anni, la preselezione del sesso, che si basa come abbiamo già detto sulla misurazione citofluorimetrica della quantità del DNA degli spermatozoi, ha dimostrato essere applicabile in molte specie di mammiferi (Johnson, 2000). Come abbiamo già ampiamente trattato, l'intera procedura di sortaggio implica una serie di step stressanti che provoca una rapida perdita della capacità fecondante degli spermatozoi limitando la loro sopravvivenza a poche ore post *sorting* (Seidel et al., 1997; Parrilla et al., 2005). Nel tentativo di minimizzare l'effetto negativo di tutti questi stress, gli sforzi dei ricercatori si sono focalizzati sull'ottimizzazione delle metodiche di preparazione e manipolazione degli spermatozoi prima e durante il passaggio attraverso il citofluorimetro, ma anche sulla modalità di conservazione degli spermatozoi sortati. Sono state testate con successo l'azione di diverse sostanze antiossidanti come la catalasi, il SOD e il sodio piruvato sugli spermatozoi sortati di ariete e toro. Nel toro Klinc e Rath (2007) hanno dimostrato come aggiungendo combinazioni di antiossidanti al medium di diluizione e allo sheat fluid, durante la procedura di sortaggio, si possa ottenere un aumento degli spermatozoi vivi e con acrosoma intatto post scongelamento, ma anche il miglioramento della qualità degli spermatozoi sortati durante la conservazione, permettendo in questo modo di raggiungere buone percentuali di fecondazione utilizzando lo stesso protocollo di inseminazione usato per il seme fresco (Klinc et al., 2007). Per quanto concerne gli spermatozoi di ariete de Graaf et al. (2007) hanno dimostrato come l'aggiunta della catalasi e del plasma seminale nel protocollo di sortaggio non è in grado di migliorare la qualità del seme sortato e crioconservato e, di conseguenza, l'efficienza del *sex-sorting* degli spermatozoi di ariete. Al contrario Leahy et al. (2010) hanno descritto sempre nell'ariete come, includendo gli antiossidanti e il plasma seminale al protocollo di sortaggio, si possa ottenere un aumento della resistenza degli

spermatozoi sortati allo stress ossidativo. Come abbiamo più volte sottolineato, gli spermatozoi di verro mostrano una sensibilità ancora maggiore all'azione deleteria delle specie reattive dell'ossigeno. Questo si traduce in un precoce deterioramento delle caratteristiche morfo-funzionali degli spermatozoi e per questo motivo è ancora più importante riuscire a mettere a punto protocolli di lavorazione e trattamento del seme che prevedano l'utilizzo di sostanze in grado di migliorarne la qualità e di conseguenza la capacità fecondante. Inoltre Strzezek (2002) ha evidenziato come gli spermatozoi di maiale abbiano una limitata difesa antiossidante rispetto a quella delle altre specie animali.

Molti ricercatori hanno tentato di individuare sostanze con proprietà antiossidanti in grado di migliorare le caratteristiche funzionali degli spermatozoi congelati o conservati allo stato liquido. Con il fine di migliorare la vitalità e la capacità fecondante degli spermatozoi di suino dopo congelamento-scongelo sono state testate molte sostanze antiossidanti come la superossido dismutasi, la catalasi (Roca et al., 2005), l' α -tocoferolo (Jeong et al., 2009; Satorre et al., 2007; Breininger et al., 2005) e altre sostanze analoghe alla vitamina E (Pena et al., 2004). Per preservare le caratteristiche morfo-funzionali degli spermatozoi di verro durante il periodo in cui vengono conservati allo stato liquido prima di essere utilizzati per la fecondazione, sono stati sperimentati l'adenosina, L-cisteina idrocloride, l'acido ascorbico, il magnesio fumarato, la prolattina (Szcześniak-Fabiańczyk et al., 2003), la melatonina (Jang et al., 2010), il glutatione, la cisteina e l'ipotaurina (Funahashi e Sano, 2005). Nell'ultimo periodo inoltre è nata la tendenza all'utilizzo di sostanze antiossidanti di origine vegetale; ad esempio Malo et al. (2011) hanno dimostrato come utilizzando il rosmarino (*Rosmarinus officinalis*), si possa migliorare la qualità degli spermatozoi epididimali di verro dopo congelamento-scongelo.

Per quanto riguarda gli spermatozoi sottoposti a sortaggio solo Grossfeld (2007) ha testato l'efficacia di alcune sostanze antiossidanti sul seme fresco, sortato conservato allo stato liquido, sul seme crioconservato e sortato-congelato. Dai risultati di questa

ricerca si è visto che l'aggiunta di piruvato e degli antiossidanti catalasi e mercaptoetanolo ha solo limitato gli effetti sulla motilità degli spermatozoi freschi, sessati e congelati mentre non ha sortito alcun effetto sulla loro morfologia e sull'integrità di membrana e acrosomiale. Dall'altra parte l'utilizzo di questi antiossidanti non ha alcun modo migliorato la qualità del seme sortato conservato sia allo stato liquido che congelato.

IMPIEGO DEL SEME SESSATO NEL MAIALE

Nella specie suina il seme sortato può essere impiegato sia per l'inseminazione *in vivo* che *in vitro*. Nella fecondazione *in vivo* il numero preciso di spermatozoi utilizzato per inseminare dipende da molti fattori, inclusa la capacità fecondante del seme del verro scelto, l'intervallo tra l'inseminazione e l'ovulazione, la manipolazione del seme prima della fecondazione e la profondità dell'inseminazione (Hunter, 2003; Vazquez et al., 2005). La procedura di sortaggio implica la produzione limitata di spermatozoi che rende necessaria una tecnica d'inseminazione che utilizzi un numero basso, o addirittura molto basso di cellule spermatiche affinché questa tecnologia possa avere un'applicazione commerciale. Inoltre gli spermatozoi ottenuti dal processo di sortaggio vengono notevolmente indeboliti dalla procedura limitando la loro sopravvivenza e la loro capacità fecondante. Di conseguenza, sono necessarie nuove strategie di inseminazione affinché vengano raggiunte alte percentuali di gravidanza in seguito all'uso di dosi contenenti un basso numero di spermatozoi sortati. La deposizione degli spermatozoi nella zona alta del tratto genitale femminile, rispetto all'IA convenzionale, permette la sopravvivenza di una percentuale maggiore di spermatozoi e una maggior colonizzazione dell'ovidutto. Nella specie suina, rispetto alle altre specie, il numero di spermatozoi sortati disponibili è molto più basso rispetto a quello utilizzato nell'inseminazione convenzionale. Per questo motivo, è ancora più forte l'esigenza di progettare

protocolli o accorgimenti in grado di permettere l'applicazione commerciale di questa tecnologia (Johnson et al., 2005).

I primi suinetti nati dall'utilizzo di spermatozoi sortati sono stati ottenuti mediante l'inseminazione intraoviduttale laparotomica utilizzando 3×10^5 spermatozoi (Johnson, 1991). Ad ogni modo questa procedura chirurgica non è applicabile dal punto di vista commerciale sia per il benessere degli animali che per il costo. Altrettanto inapplicabile è l'IA intracervicale poiché nel suino richiede $2-3 \times 10^9$ spermatozoi a inseminazione, numero che non è possibile produrre in un tempo ragionevole.

Per questo motivo Martinez et al. (2001) hanno sviluppato una metodica che permette la deposizione degli spermatozoi all'interno del corno uterino mediante l'utilizzo di uno speciale catetere flessibile (Martinez et al., 2002) raggiungendo una riduzione significativa del numero degli spermatozoi per inseminazione, con il mantenimento di una performance riproduttiva ottimale (Vazquez et al., 2005).

Questa tecnica, che prende il nome di inseminazione uterina profonda (DUI: deep intrauterine insemination), viene effettuata inseminando una dose di 50-70 milioni di spermatozoi nel terzo anteriore del corno uterino in combinazione con il controllo ormonale dell'ovulazione, e la sua efficacia è stata dimostrata nelle inseminazioni con seme sortato suino (Rath et al., 2003; Vazquez et al., 2003; Grossfeld et al., 2005).

Poiché con l'utilizzo del *sorting* si ottengono 10-15 milioni di spermatozoi all'ora, servono almeno 5-10 ore di sortaggio per ottenere un numero di cellule sufficienti ad effettuare un'inseminazione, rendendo impossibile l'applicazione di questa tecnica su vasta scala. Inoltre, le percentuali di fecondazione sono significativamente più basse nelle scrofe inseminate con gli spermatozoi sortati rispetto a quelli non sortati ed il numero di suinetti per figliata tende ad essere inferiore rispetto a quelle ottenute utilizzando seme non sessato (Grossfeld et al., 2005; Vazquez et al., 2003). Uno dei fattori che influisce sulla bassa percentuale di scrofe che raggiungono il parto è la perdita di embrioni all'inizio della gravidanza (Vazquez et al., 2003) ed inoltre

l'inseminazione intrauterina profonda aumenta la percentuale di scrofe con una fertilizzazione unilaterale o parzialmente bilaterale, portando alla riduzione del numero di suinetti (Martinez et al., 2006). Di conseguenza, il numero degli spermatozoi sortati depositati potrebbe essere insufficiente per produrre abbastanza suinetti necessari al mantenimento della gravidanza.

Un approccio pratico all'inseminazione fatta con l'utilizzo di spermatozoi sortati potrebbe risiedere nella progettazione di nuove tipologie di cateteri in grado di permettere l'attraversamento della giunzione utero-tubarica per deporre il seme a livello oviduttale. Nel frattempo, si stanno sviluppando nuove strategie alternative per depositare un numero di spermatozoi sortati sempre più basso. Una tecnica che viene oggi utilizzata e che ha dato buoni risultati di fecondazione, è l'inseminazione intra-oviduttale laparoscopica (Vazquez et al., 2006).

La laparoscopia è una tecnica meno invasiva rispetto la laparotomia e permette di depositare il seme direttamente nell'utero o nell'ovidutto e inoltre può essere effettuata direttamente in allevamento da personale specializzato (Vazquez et al., 2009).

L'inseminazione mediante laparoscopia nel tratto superiore del corno uterino (vicino alla giunzione utero-tubarica) permette di ottenere alte percentuali di fecondazione utilizzando $10 - 20 \times 10^6$ spermatozoi per corno (Fantinati et al., 2005; Brussow et al., 2006), come è stato precedentemente riportato da Krueger et al (1999) mediante laparotomia. Questa tecnica permette di ridurre 5 volte la quantità di spermatozoi utilizzati in una dose rispetto al quantitativo di cellule spermatiche utilizzate nell'inseminazione intrauterina profonda. Inoltre è stato anche valutato l'effetto del momento in cui viene effettuata l'inseminazione, in relazione all'ovulazione (follicoli preovulatori, ovulatori o ovulati), sulla penetrazione e la fecondazione polispermica degli oociti. La percentuale di polispermia è risultata molto alta quando sono state inseminate, direttamente a livello oviduttale, scrofe con oociti ovulati, mentre, quando gli spermatozoi sono stati depositati prima dell'ovulazione, è stata registrata una percentuale di polispermia molto bassa (Vazquez et al., 2006).

In un recente lavoro eseguito da Garcia et al. (2007) è stata ottenuta un'alta percentuale di fertilizzazione utilizzando 0.3×10^6 spermatozoi sortati, concentrati mediante sedimentazione e in seguito depositati mediante laparoscopia dopo 16-18 h dal *sex-sorting*. La presenza del plasma seminale, o delle PSP-I/PSPII, eterodimeri che compongono il plasma seminale, non hanno influenzato in maniera negativa la fertilizzazione. Inoltre, le più alte percentuali di fecondazione sono state ottenute quando gli eterodimeri sono stati addizionati al medium di raccolta e sono rimasti in contatto con le cellule spermatiche fino al momento della fecondazione. Tutti questi lavori hanno dimostrato come l'inseminazione mediante laparoscopia offra la possibilità di depositare un numero molto basso di spermatozoi a livello oviduttale prima dell'ovulazione, migliorando la fertilizzazione con gli spermatozoi sortati.

Negli ultimi anni importanti progressi hanno condotto all'avanzamento della tecnologia ad un punto tale da diventare realizzabile l'utilizzo di seme sortato negli allevamenti suini. Ad ogni modo la combinazione dell'aumentata efficienza degli spermatozoi sortati con una maggiore capacità fecondante, i miglioramenti nelle procedure di crioconservazione e lo sviluppo di tecniche di IA che permettano una diminuzione del numero di spermatozoi per inseminazione, mantenendo elevate le percentuali di fecondazione, faciliterà la diffusione di questa tecnologia.

Poiché il numero di spermatozoi necessari per la fecondazione *in vitro* (IVF) è molto basso, anche la messa a punto di un buon sistema IVM-IVF potrebbe aiutare la produzione di suini di sesso predeterminato dagli spermatozoi sortati. Nel 1993 Rath e collaboratori hanno ottenuto i primi embrioni dall'IVF effettuata con seme sortato. In seguito, sono state ottenute due figliate dopo trasferimento in scrofe riceventi di embrioni prodotti *in vitro* con spermatozoi sortati (Rath et al., 1997). Ad ogni modo, sebbene le tecniche per la produzione di embrioni di suino *in vitro* siano progredite molto velocemente negli ultimi anni, la penetrazione polispermica degli oociti rimane un problema persistente, poiché porta ad una bassa efficienza nella produzione di embrioni vitali. Un'alternativa, per evitare la polispermia, potrebbe essere l'iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi (ICSI) (Di Bernardino et al., 2000). Nel 2003,

sono nati dei suinetti maschi dal trasferimento in scrofe riceventi di embrioni prodotti mediante l'ICSI (Probst e Rath, 2003). Tuttavia, l'efficienza della produzione suina rimane bassa e solo lo 0.5% di oociti trasferiti dopo l'ICSI portano alla nascita di suinetti vivi (Kikuchi et al., 2008). Se l'efficacia dell'IVF o dell'ICSI potesse essere migliorata, l'uso di queste tecnologie, combinato con una nuova procedura di trasferimento non chirurgico degli embrioni (Martinez et al., 2004), potrebbe portare ad un grande sviluppo dell'uso degli spermatozoi sortati.

PARTE SPERIMENTALE

SCOPO DELLA RICERCA

Le cellule spermatiche di suino sottoposte alla procedura del *sex-sorting* presentano una serie di modificazioni morfologiche e funzionali che compromettono nel tempo la loro sopravvivenza e la loro capacità fecondante (Maxwell et al., 1998).

Gli spermatozoi di suino, inoltre, a causa della suscettibilità ai danni indotti dalla crioconservazione, in seguito alla procedura di sortaggio vengono solitamente conservati allo stato liquido a temperature di refrigerazione, il che implica un ulteriore peggioramento delle caratteristiche morfo-funzionali delle cellule spermatiche sortate (Parrilla et al., 2005).

Quindi lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le caratteristiche morfo-funzionali delle cellule spermatiche in seguito all'applicazione della procedura del *sex-sorting* e la conseguente conservazione, e quindi di cercare di migliorare i parametri qualitativi del seme mediante l'aggiunta di sostanze antiossidanti e la messa a punto di una nuova metodica di conservazione.

La ricerca è stata divisa in tre esperimenti.

Nel primo esperimento, lo scopo è stato quello di identificare i danni causati dall'azione sinergica della procedura di sortaggio e della conservazione allo stato liquido a 15°C per 24-26 h utilizzando come parametri la vitalità, l'integrità degli acrosomi e la presenza e localizzazione dell'Hsp70. Si è inoltre voluto valutare se l'associazione di tali tecniche induca una alterazione della capacità fecondante in vitro.

Una volta identificate le modificazioni a carico degli spermatozoi, lo scopo del secondo esperimento è stato quello di identificare e quindi testare delle sostanze la cui attività fosse in grado di minimizzare l'azione dannosa del *sex-sorting* e della conservazione sulle cellule spermatiche. Poiché vari autori hanno già identificato i

ROS (reactive oxygen species: specie reattive dell'ossigeno) come i principali responsabili del deterioramento della funzionalità spermatica (Johnson et al., 2000), sono state testate alcune sostanze antiossidanti che hanno una funzione di ROS scavenger (neutralizzatori radicali liberi dell'ossigeno); a questo fine gli antiossidanti epigallocatechina-3-gallato (EGCG), sodio piruvato+catalasi, e superossido dismutasi (SOD) sono stati addizionati al seme di suino durante i vari passaggi previsti dal protocollo del *sex-sorting*, ovvero durante la colorazione, il passaggio attraverso il citofluorimetro e la conseguente conservazione di 24 h a 15 °C.

Per la conservazione del seme di suino oltre alla la conservazione allo stato liquido e al congelamento Torre e collaboratori (2002) hanno messo a punto l'incapsulazione delle cellule spermatiche in membrane di alginato di bario. Nel terzo esperimento è stata quindi messa in comparazione la vitalità, l'integrità acrosomiale e la capacità fecondante delle cellule spermatiche sortate e conservate mediante incapsulazione con i campioni di seme sortato conservato allo stato liquido.

MATERIALI E METODI

Tutti i reagenti utilizzati sono stati ottenuti dalla "Sigma Chemical CO" (St. Louis, MO, USA), tranne dove venga diversamente specificato.

Prelievo dell'eiaculato

Le frazioni ricche degli eiaculati di due verri maturi, di provata fertilità, sono state prelevate mediante la tecnica della mano guantata e sono state subito diluite in un ugual volume di AndrohepTM (Minitüb, Tiefenbach, Germany). Allo scopo di minimizzare le differenze tra gli eiaculati appartenenti ad individui diversi (il cosiddetto "effetto verro") i campioni sono stati mescolati; in seguito sono stati ulteriormente diluiti fino ad ottenere una concentrazione di 100×10^6 spermatozoi/ml. Aliquote di 1 ml di seme diluito sono state quindi trasferite in Falcon e colorate con

10 µl della soluzione stock di Hoechst 33342 (5 mg/ml) per un'ora a 35°C al buio. Subito prima del sessaggio è stato aggiunto a ciascun campione 1 µl della soluzione stock di colorante alimentare FD&C # 40 (Warner Jenkinson, St. Louis, MO, USA) (25mg/ml). I campioni sono stati quindi filtrati mediante l'utilizzo di filtri di nylon con porosità di 60µm allo scopo di rimuovere gli eventuali detriti e aggregati di spermatozoi.

Flow sorting

Per sessare gli spermatozoi è stato utilizzato un Mo-Flo SX® flow cytometr/sperm sorter (DakoCytomation Inc., Fort Collins, CO, USA) equipaggiato con argon laser (lunghezza d'onda di 351 a 150mW). Come sheat fluid è stato usato il DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline). Lo sperm sorter ha lavorato utilizzando una pressione di 40 psi e una velocità di 25000 eventi/sec. Gli spermatozoi sessati hanno subito una deflezione, diversa a seconda del sesso di appartenenza, in tubi da 20ml di polipropilene contenenti 500 µl di Tes-Tris buffer supplementato con il 2.5% di tuorlo d'uovo e 10 µl di plasma seminale di verro scongelato. Dopo aver ottenuto un quantitativo di seme sessato pari a 8×10^6 spermatozoi in ciascun tubo, le due popolazioni di spermatozoi sono state mescolate, poiché la predeterminazione del sesso non costituiva un obiettivo dell'esperimento. I campioni sono stati quindi centrifugati alla velocità di $800 \times g$ per 20 minuti ed il pellet è stato risospeso in 400 µl di Androhep™ addizionato con l'1% di plasma seminale.

Valutazione dell'integrità della membrana plasmatica (vitalità)

La vitalità del seme è stata valutata incubando per 5 minuti a 37°C e al buio 25 µl di seme (100×10^6 spz/ml) di ciascun campione in presenza di 2 µl di una soluzione 0.1 µM di Ioduro di Propidio (Molecular Probes, Leiden, Olanda) e 2 µl di una soluzione 23 µM di SYBR Green 14. Il SYBR-14, colorante permeabile che si lega al DNA, viene deacetilato dalle esterasi intracellulari. Il colorante fluorescente deacetilato non può diffondere nuovamente all'esterno dello spermatozoo che è reso identificabile

mediante la fluorescenza verde del nucleo. Diversamente, lo Ioduro di Propidio (IP), che emette una fluorescenza rossa (625 nm), permette di osservare solo la testa degli spermatozoi con membrana danneggiata in quanto, pur essendo capace di legarsi al DNA, non è permeabile alla membrana cellulare ed è quindi in grado di oltrepassarla solo quando la sua integrità risulta compromessa.

Una volta terminata l'incubazione, 10 μ l della sospensione di spermatozoi colorati è stata disposta su di un vetrino portaoggetti e coperta delicatamente con un copri oggetto. Le valutazioni sono state eseguite utilizzando un microscopio a fluorescenza Nikon, dotato di un doppio set di filtri (FITC e TRIC), osservando circa 200 spermatozoi per ogni campione. Gli spermatozoi che presentavano a livello della testa una fluorescenza rossa o una fluorescenza sia rossa che verde sono stati classificati come morti, mentre quelli caratterizzati dalla sola colorazione verde sono stati considerati vivi.

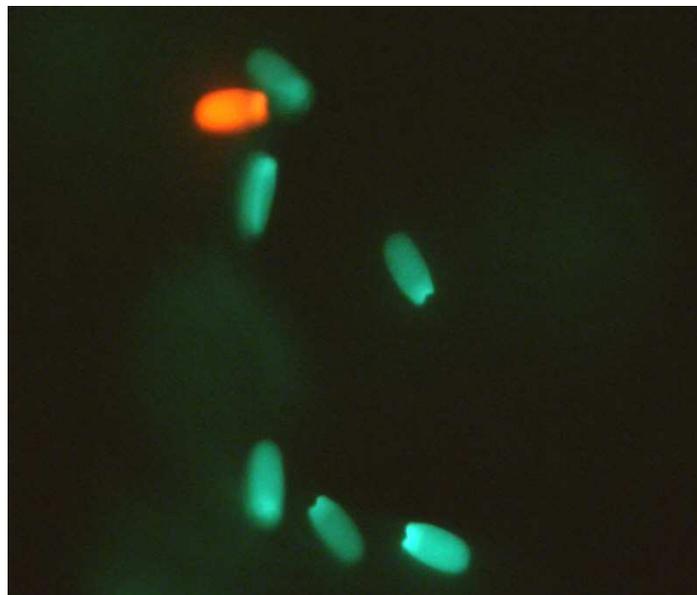


Fig. 2. Esempio di valutazione della vitalità mediante la colorazione SYBR green-PI.

Valutazione dell'integrità dell'acrosoma

L'integrità dell' acrosoma è stata valutata mediante l'uso di una lectina derivata dal *Pisum sativum* FITC coniugata (FITC/ PSA). Questa particolare lectina ha la proprietà di legarsi in maniera specifica al contenuto dell'acrosoma (Cross et al., 1986) e permette di valutarne l'integrità o la sua compromissione. Gli spermatozoi sono stati lavati (centrifugazione per 2 minuti a 800 x g) dal medium di incubazione, ripresi in DPBS e sottoposti ad un secondo lavaggio per rimuovere le proteine solubili ed evitare la formazione di precipitati. Il pellet è stato ripreso con una soluzione al 95% di etanolo e mantenuto a 4°C per almeno 30 minuti. Tale passaggio è necessario per la permeabilizzazione della membrana plasmatica e acrosomiale e per ottenere una maggiore intensità della reazione della lectina con i componenti interni dell'acrosoma (Cross e Watson, 1994). La soluzione di spermatozoi fissati è stata lasciata asciugare su un vetrino riscaldato su piastra a 37°C e successivamente è stata aggiunta una soluzione PSA FITC-coniugata (5 µg PSA-FITC/ 1 ml H₂O).

Dopo 15 minuti di incubazione al buio, sono stati eseguiti due lavaggi in PBS per rimuovere l'eccesso di colorante e sono stati montati con una goccia di montante Vectashield e Ioduro di Propidio (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

I campioni montati sono stati quindi osservati al microscopio a fluorescenza. La presenza del segnale verde fluorescente a livello di acrosoma è stato considerato indicativo dell'integrità acrosomiale, mentre una parziale o totale assenza della fluorescenza è stata valutata indicativa di una rottura acrosomiale o di una avvenuta reazione acrosomiale.

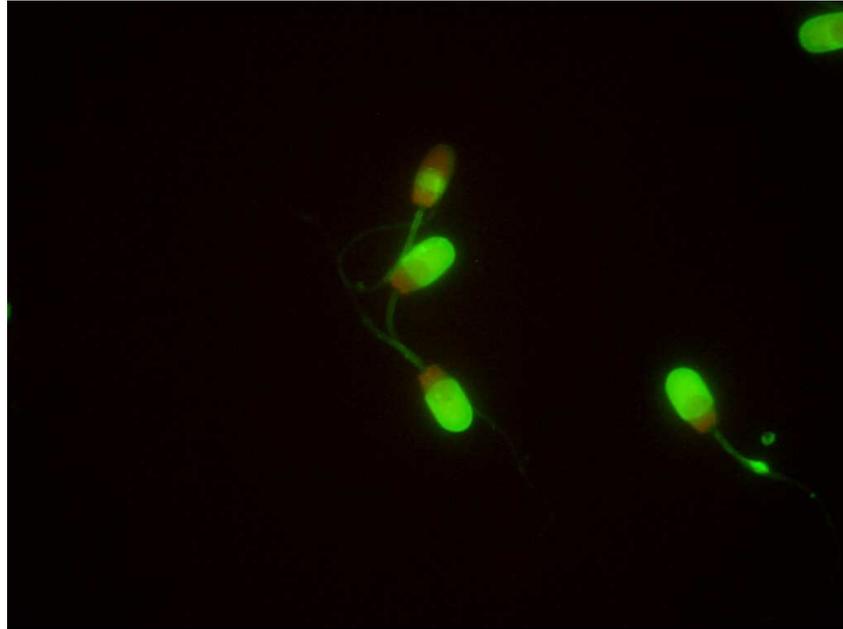


Fig. 3. Esempio di colorazione PSA-FITC coniugata per la valutazione dello stato dell'acrosoma. Gli spermatozoi che presentano gli acrosomi verdi con una netta linea a livello di membrana acrosomiale vengono classificati come “integri”.

Valutazione dell'esocitosi acrosomiale

Per differenziare gli spermatozoi andati incontro a reazione acrosomiale da quelli con danni agli acrosomi è stata utilizzata la colorazione FITC-PNA/PI. La PNA è una lectina, derivante dall'*Arachis Hypogaea*, che si lega in maniera selettiva alla membrana acrosomiale esterna permettendo la valutazione della reazione acrosomiale. Circa 50 μ l della sospensione di seme, dopo essere stati lavati due volte con il PBS, sono stati colorati con 2.5 μ l della soluzione stock FITC-PNA (0.2 mg/ml in acqua bidistillata) e 3.5 μ l della soluzione stock di PI (0.5 mg/ml in acqua bidistillata) per dieci minuti al buio. Questa colorazione, a differenza della precedente, permette di distinguere gli spermatozoi positivi alla lectina perché morti e con membrane lesionate da quelli vivi andati incontro a esocitosi del contenuto dell'acrosoma.

Aliquote delle sospensioni di spermatozoi in seguito a colorazione sono state analizzate con il microscopio a fluorescenza. Gli spermatozoi che non presentavano la positività del segnale per lo Ioduro di Propidio e neanche per il FITC-PNA sono stati considerati come vivi con acrosoma intatto, mentre quelli PI negativi e FITC-PNA positivi sono stati classificati come vivi ma con avvenuta esocitosi del contenuto acrosomiale. Le cellule positive per lo Ioduro di Propidio , sia FITC-PNA positive che negative, sono state classificate come morte.

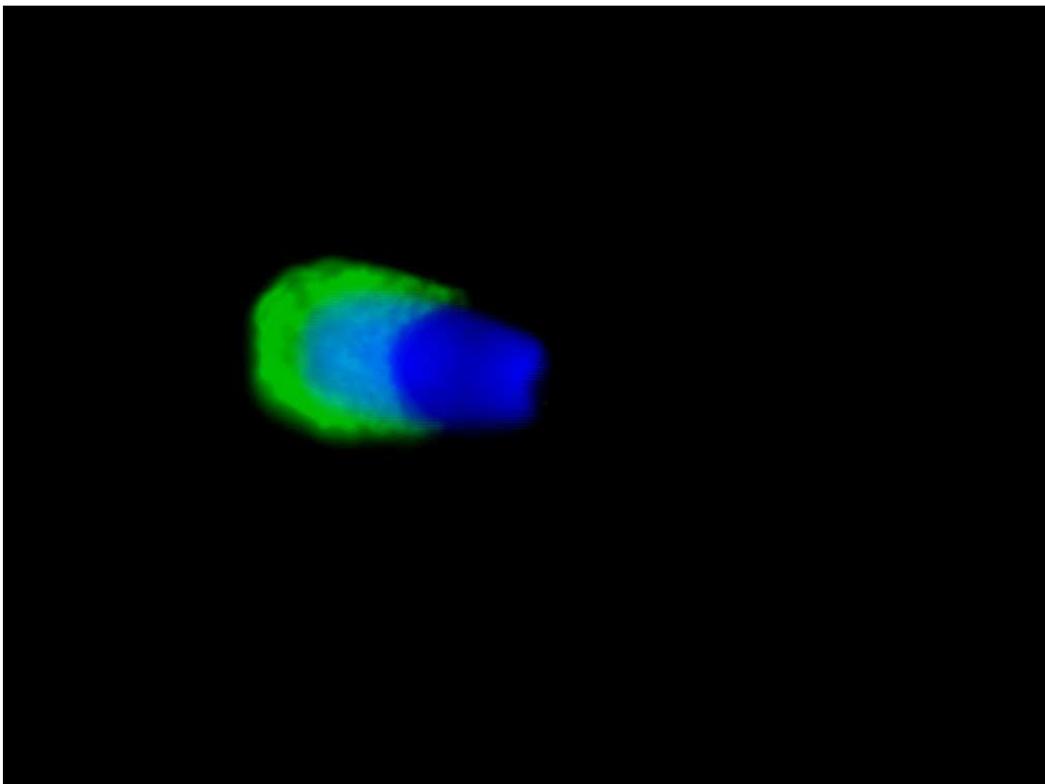


Fig. 4 Esempio di colorazione PNA coniugata al FITC per la valutazione dell'esocitosi dell'acrosoma. Gli spermatozoi che presentano la colorazione verde a livello acrosomiale sono andati incontro all'esocitosi del contenuto acrosomiale.

Valutazione dell'attivazione delle caspasi

L'attivazione delle caspasi, proteine coinvolte nel processo apoptotico, è stata rilevata mediante la colorazione FITC-VAD-FMK; il VAD-FMK è un inibitore delle caspasi permeabile alla membrana cellulare, coniugato al fluorocromo FITC, in grado di legarsi attraverso legami covalenti alle caspasi solo in seguito alla loro attivazione.

Prima di essere sottoposti a colorazione gli spermatozoi sono stati lavati due volte in PBS (centrifugazione per 2 minuti a 800 x g) allo scopo di rimuovere i detriti e di evitare la formazione di precipitati allontanando le proteine solubili. In seguito alla seconda centrifugazione il pellet contenente le cellule spermatiche è stato risospeso in 1 ml di PBS e incubato con 5 µl di FITC-VAD-FMK a 37°C per circa 20 minuti al buio. Dopo questo periodo di incubazione gli spermatozoi sono stati rilavati due volte in PBS per allontanare il colorante che non si è legato alle cellule ed il pellet ottenuto in seguito alla seconda centrifugazione è stato risospeso in 200 µl di PBS. A questo punto sono stati aggiunti 2 µl di una soluzione di ioduro di propidio (PI) (0.5 mg/ml) per determinare la percentuale di cellule morte e 0.2 µl della soluzione stock di Hoechst 33342 (5 mg/ml) solo nei campioni di spermatozoi non sottoposti al processo di sortaggio e quindi non controcolorati. Dopo qualche minuto a temperatura ambiente 10 µl della soluzione di spermatozoi sono stati posti sul vetrino portaoggetto e quindi delicatamente coperti dal coprioggetto; si è proceduto quindi all'analisi dei campioni utilizzando il microscopio a fluorescenza.

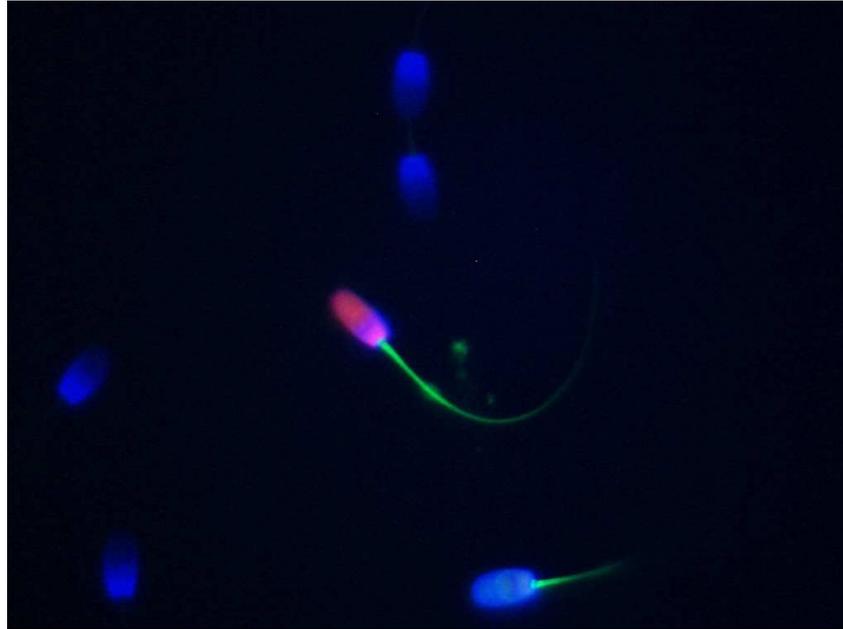


Fig. 5. Esempio di colorazione FITC-VAD-FMK per la valutazione dell'attivazione delle caspasi.

Immunolocalizzazione dell'Hsp70

Tutte le procedure sono state condotte a temperatura ambiente se non diversamente specificato. Aliquote di spermatozoi di controllo, sortati, sortati e conservati a 17°C sono stata poste su vetrini portaoggetto, previamente coperti con poli-L-lisina, e fissati con etanolo a - 20°C per 5 minuti e con acetone per 30 secondi. Questi campioni sono stati quindi lavati in PBS e bloccati utilizzando PBS con il 10% di siero normale ovino (normal sheep serum) per almeno 30 minuti. Le diluizioni degli anticorpi sono state eseguite utilizzando PBS e il 10% di FCS (fetal calf serum). L'anticorpo monoclonale anti-Hsp70 (C92F3A-5 mAb, Stressgen, Ann Arbor, Mi, USA) è stato aggiunto ad una diluizione 1: 200. L'incubazione è stata effettuata "overnight" a 4°C. Dopo essere stati lavati abbondantemente con PBS, i campioni sono stati incubati con l'anticorpo secondario sheep-anti-mouse FITC-coniugato diluito 1:800 per 1 h al buio. I vetrini sono stati quindi rilavati in PBS, per allontanare la quantità eccedente di anticorpo secondario, e montati con il Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA); i campioni di controllo freschi, i cui spermatozoi non sono stati previamente colorati con l'Hoechst 33342,

sono stati invece montati con il Vectashield mounting medium contenente anche Ioduro di Propidio. Allo scopo di verificare la specificità dell'anticorpo secondario, alcuni vetrini sono stati incubati solo con quest'ultimo omettendo l'incubazione dell'antisiero primario. Gli spermatozoi sono stati in seguito valutati con il microscopio a fluorescenza. Sulla base della diversa localizzazione del segnale immunopositivo dell'Hsp70 sugli spermatozoi fissati sono state identificati e differenziati tre pattern: 1) immunoreattività confinata ad un'area di forma triangolare ben definita a livello di segmento equatoriale (pattern non-capacitato); 2) immunoreattività a livello di linea equatoriale a volte associata ad una linea semicircolare sul limite anteriore del segmento equatoriale (pattern capacitato); 3) spessa banda subequatoriale immunopositiva con un lieve segnale di forma triangolare (pattern reatto).

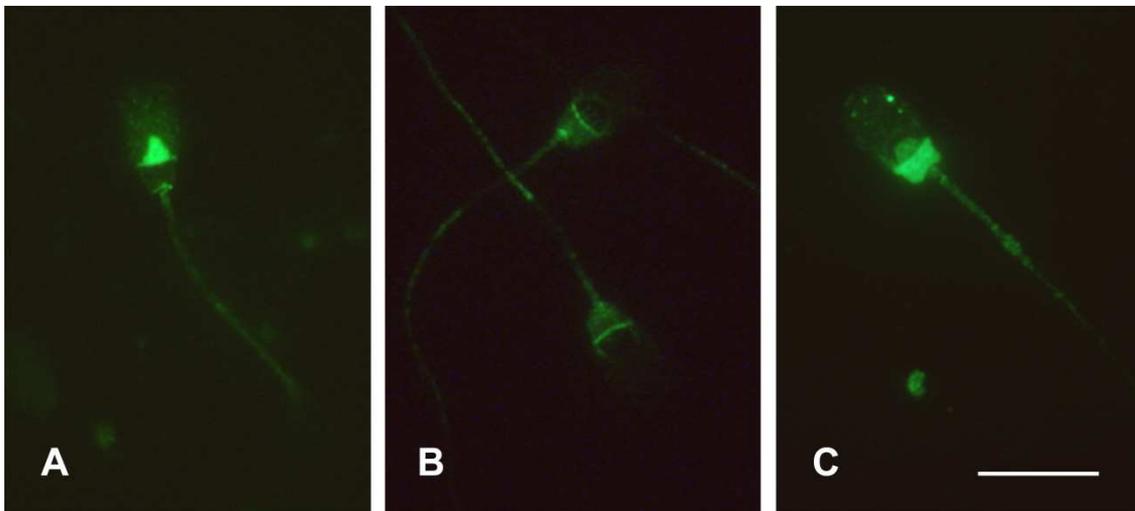


Fig. 6. Rilocalizzazione dell'Hsp 70 negli spermatozoi di verro in diversi momenti funzionali. **A)** spermatozoi "freschi" con la caratteristica immunoreattività di forma triangolare del segmento subequatoriale; **B)** spermatozoi capacitati con la linea equatoriale positiva; **C)** spermatozoi reatti.

Western Blot dell'Hsp70

Aliquote contenenti 5×10^6 spermatozoi di controllo, sortati 0 h, sortati e conservati 24-26 h, sono state lavate due volte con PBS e centrifugate a $850 \times g$ per 10 minuti; dopo aver eliminato il surnatante, il pellet finale è stato congelato e mantenuto a -80°C fino all'utilizzo. Al momento dello scongelamento il pellet è stato risospeso nel SDS buffer (Tris-Hcl 62.5 mM pH 6.8; SDS 2%, glycerol 20%). Le proteine derivanti da 1×10^6 cellule spermatiche sono state fatte correre su di un Gel Bis-Tris NuPage al 10% (Gibco-Invitrogen, Paisley, UK) per 50 minuti a 200V, quindi sono state elettroforeticamente trasferite su di una membrana in nitrocellulosa. Dopo aver lavato la membrana in PBS, il corretto trasferimento delle proteine è stato verificato colorando la membrana con il Ponceau Red allo 0.2% ed i gel con il Blue di Comassie. Per evitare la formazione di legami aspecifici proteine-anticorpo, le membrane in nitrocellulosa sono state bloccate con una soluzione di PBS-Tween-20 contenente il 5% di polvere di latte, per 1h a temperatura ambiente. Le membrane sono state incubate overnight a 4°C con un anticorpo monoclonale anti-Hsp70 (Stressgen) diluito 1:1000 in Tris Buffered Saline-Tween-20 (20mM Tris-Hcl, pH 7.4, 500 mM NaCl, 0.1% Tween-20). Dopo diversi lavaggi con il PBS Tween-20 le membrane sono state incubate prima con un anticorpo secondario goat anti-mouse biotina coniugato diluito 1:10000, poi con un anticorpo anti-biotina HRP (horseradish peroxidase)-coniugato diluito 1:1000. I Western blot sono stati acquisiti utilizzando un substrato chemio luminescente (Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate, Pierce, Rockford, IL, USA) secondo le istruzioni d'uso. L'intensità del segnale luminescente delle bande risultanti è stata acquisita attraverso il Fluor-STM Multimager usando il Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). Allo scopo di normalizzare/ quantificare le bande di Hsp70, le membrane sono state strippate (in breve: le membrane sono state lavate 5 minuti in acqua, poi 5 minuti in 0.2 M di NaOH e lavate di nuovo in acqua) e ri-incubate con l'anticorpo della proteina house-keeping β -tubulina (diluizione 1:500, sc-5274 Santa Cruz

Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA). Il relativo contenuto proteico (Hsp70/ β -tubulina) è stato espresso in unità arbitrarie (AU).

Maturazione in vitro degli oociti (IVM)

I complessi cumulo-oocita (COC) sono stati aspirati da follicoli con diametro di 4-6 mm provenienti da ovaie raccolte in un mattatoio locale, selezionati mediante uno stereomicroscopio e trasferiti in una capsula petri (35 mm, Nunclon, Denmark) contenente 2 ml di PBS modificato supplementato con lo 0.4% di BSA (bovine serum albumin).

I CCOs selezionati sono stati sottoposti a tre lavaggi con medium di maturazione NCSU37 (Petters e Wells, 1993) addizionato con insulina 5 μ g/ml, cisteina 0,57 mM, glutamina 1,0 mM, EGF 10ng/ml, mercaptoetanolo 50 μ M e con il 10% di liquido follicolare. Gruppi di 50 CCOs sono stati trasferiti all'interno di appositi pozzetti (Nunc 4-well multidish) contenenti 500 μ l dello stesso medium, addizionato con db-AMPc 1 mM, 10 UI/ml eCG (Folligon, Intervet, Olanda) e 10 UI/ml hCG (Corulon, Intervet, Olanda) e incubati a 39°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂ e al 7% di O₂. Dopo 22 ore di coltura i CCOs sono stati trasferiti in medium di maturazione privo di supplementi ormonali e dbAMPc e coltivati per altre 24 ore (Funahashi et al., 1997).

Fecondazione in vitro (IVF)

Nell'esperimento 1 aliquote di seme di controllo e sortato, a 0 ore e a 24-26 ore dopo il sortaggio, sono state lavate due volte con medium Brackett & Oliphant (Brackett e Oliphant, 1975) supplementato con il 12% di siero fetale bovino (FCS, Gibco, Invitrogen, Italy) e con 0.7 mg/ml di caffeina (medium IVF). Sono state quindi valutate le concentrazioni degli spermatozoi e gruppi di 50 oociti maturi sono stati denudati delle cellule del cumulo mediante ripetute pipettate; gli oociti decumulati

sono stati quindi trasferiti in pozzetti contenenti 500 µl di medium da IVF e 5×10^5 spermatozoi/ml (rapporto oocita/ spermatozoi 1:5000). Dopo 1 ora di coincubazione, gli oociti sono stati trasferiti in pozzetti contenenti medium da fecondazione fresco.

È stata inoltre effettuata una seconda serie di inseminazioni con un numero più basso di spermatozoi per oocita allo scopo di comprendere se un alto numero di spermatozoi durante una breve coincubazione, secondo il protocollo normalmente utilizzato nel nostro laboratorio, potesse mascherare un eventuale effetto del sortaggio e della conservazione sulla capacità fecondante degli spermatozoi. Per questo motivo gruppi di 50 oociti maturati *in vitro* sono stati trasferiti in 100 µl di medium IVF contenente 5×10^3 spermatozoi in modo che il rapporto oocita/spermatozoi fosse di 1:100. Dopo 5 ore di coincubazione i presunti zigoti sono stati trasferiti in pozzetti contenenti medium da fecondazione fresco e coltivati fino alla fissazione.

I presunti zigoti, circa 20 ore dopo sono stati montati su vetrini, fissati in acido acetico/etanolo (1:3) per 24 ore e in seguito colorati con lacmoid. Gli oociti sono stati osservati utilizzando un microscopio a contrasto di fase. Gli oociti sono stati valutati penetrati quando contenevano nel loro citoplasma teste di spermatozoi decondensate e/o pronuclei maschili e i due globuli polari. Gli oociti degenerati o immaturi non sono stati considerati. I parametri valutati sono stati: la percentuale di penetrazione (numero di oociti penetrati/ numero totale inseminati), il tasso di normospermia (numero di oociti contenenti solo una testa o un pronucleo maschile/ numero totale penetrati) e l'efficienza totale della fecondazione (oociti normospermici/ inseminati).

Nell'esperimento 3 dopo 24, 48 e 72 ore dall'incapsulazione il seme sessato diluito (controllo) e quello aspirato dalle capsule è stato utilizzato per le fecondazioni *in vitro*. I campioni sono stati manipolati come nell'esperimento 1. Al termine del periodo di maturazione *in vitro*, gli oociti sono stati meccanicamente decumulati e trasferiti in 100µl di IVF medium contenente circa 3×10^4 spermatozoi/ml. Dopo 4 ore di coincubazione, a 39°C in atmosfera umidificata, gli oociti sono stati trasferiti in IVF

medium fresco e lasciati in coltura fino alla fissazione. Gli oociti sono stati osservati mediante microscopio a contrasto di fase e classificati come nell'esperimento 1.

Incapsulazione del seme

Per la preparazione delle capsule di controllo è stata prelevata un'aliquota di 3ml di materiale seminale, conservato a temperatura ambiente, a cui è stata addizionata una soluzione satura di BaCl₂ in modo da raggiungere una concentrazione 50mM di ione Ba²⁺. La sospensione così ottenuta è stata gocciolata, mediante una siringa con un ago ipodermico (23G, 0.60×30mm), in 300ml di alginato sodico a media viscosità (Sigma Aldrich), in concentrazione di 0.5% p/v e pH=7.2-7.5, e mantenuta in costante agitazione.

In seguito al contatto tra la goccia di estruso, contenente lo ione bivalente, e la soluzione di alginato, gli ioni diffondono verso la superficie della goccia e, in corrispondenza dell'interfaccia, determinano la gelificazione dell'alginato e la conseguente formazione di una membrana attorno al nucleo.

Le capsule sono state lasciate nella soluzione di alginato per 45 minuti, sotto blanda agitazione, e, in questo periodo, la loro membrana ha subito un continuo aumento di spessore grazie alla diffusione degli ioni bivalenti liberi verso la superficie esterna della goccia. Finita questa fase di accrescimento, le capsule sono state recuperate attraverso filtrazione, lavate due volte con una soluzione contenente glucosio monoidrato e bicarbonato di sodio, allo scopo di allontanare le tracce di alginato non gelificato; quindi sono state sospese in una soluzione 5% p/v di Nutrixcell (Imv Technologies Italia Srl), e conservate in questo diluente di seme suino alla temperatura di 15°C.

Le capsule di seme suino sortato risospeso in plasma seminale omologo sono state allestite in modo analogo.

DISEGNO SPERIMENTALE

ESPERIMENTO 1

1.1 Valutazione dei parametri qualitativi del seme di suino sessato conservato per 24-26 h a 15°C

Una volta terminata la procedura di sortaggio, parte del seme è stato valutato immediatamente mentre un'aliquota è stata risospesa in Androhep^{TM®} supplementato con l'1% di plasma seminale e conservata allo stato liquido per 24-26 ore a 15°C.

Per la valutazione della qualità del seme sono state analizzate l'integrità di membrana, l'esocitosi acrosomiale, l'immunolocalizzazione dell'Hsp70 ed il contenuto di Hsp70.

I gruppi analizzati sono stati:

- (1) controllo 0 h (spermatozoi freschi diluiti);
- (2) sortati 0 h;
- (3) seme di controllo conservato per 24-26 h;
- (4) seme sortato conservato per 24-26 h.

1.2 Fecondazione in vitro utilizzando seme di suino sortato e conservato 24-26 h a 15°C

Utilizzando gli spermatozoi appartenenti ai gruppi sopradescritti sono state effettuate due tipologie di IVF:

- coincubazione dei gameti per 1 ora con un rapporto oocita/spermatozoi di 1: 5000;
- coincubazione dei gameti per 5 ore con un rapporto oocita/spermatozoi di 1: 100.

ANALISI STATISTICA ESPERIMENTO 1

I dati sono presentati come media \pm SEM; tutte le prove sono state ripetute almeno cinque volte. I dati sono stati analizzati con una ANOVA ad una via. Quando l'ANOVA ha rilevato una differenza significativa, i valori sono stati confrontati usando il test LSD e il livello di significatività è stato settato a $P < 0.05$. E' stato utilizzato il software Macintosh SPSS 11.

RISULTATI ESPERIMENTO 1

1.1.1 Integrità della membrana plasmatica

I dati sull'integrità di membrana degli spermatozoi sortati e non sortati prima e dopo la conservazione sono riassunti nella figura 6.

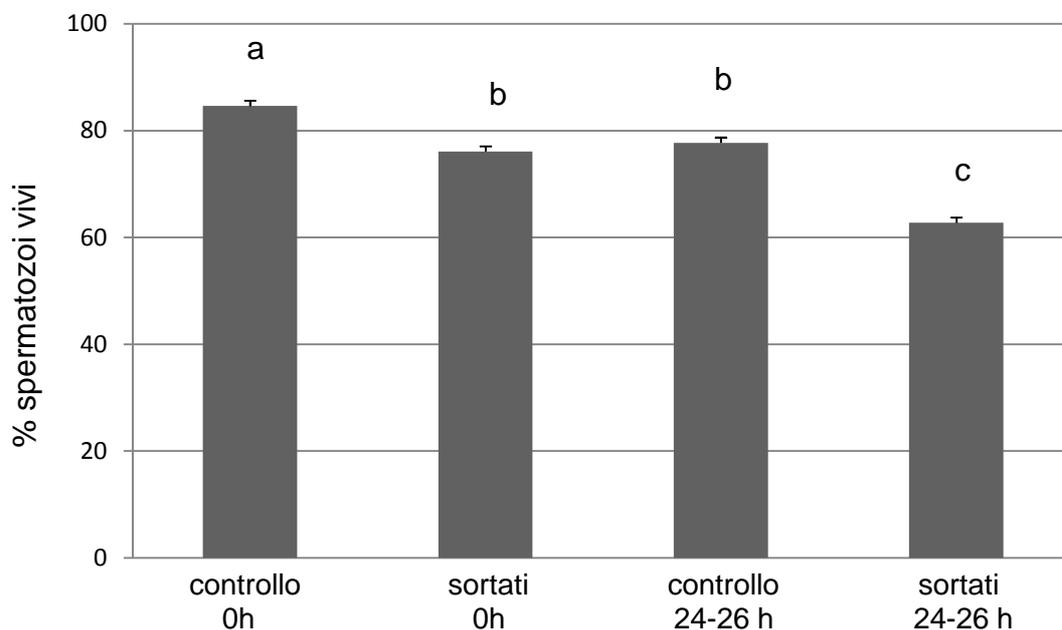


Fig. 7. Effetto del sortaggio e della conservazione per 24-26 ore sulla vitalità degli spermatozoi valutata mediante colorazione SYBR-Green/PI. Sono stati contati un minimo di 200 spermatozoi per campione. I dati sono indicati come percentuali \pm SEM di otto replicati. Lettere diverse indicano valori significativamente diversi, $P < 0.05$.

La percentuale di cellule vive è stata influenzata negativamente sia dalla procedura di sortaggio che dalla conservazione ($P < 0.05$). Inoltre la percentuale di spermatozoi sortati con membrana integra ha subito una diminuzione significativa dopo la conservazione allo stato liquido per 24-26 ore rispetto a tutti gli altri gruppi.

1.1.2 Esocitosi acrosomiale

I risultati sono riassunti nella tabella n. 1. La percentuale di spermatozoi vivi con acrosoma intatto (PNA-/PI-) e quella delle cellule vive con acrosoma reatto (PNA+/PI-) non sono state influenzate né dalla conservazione né dalla procedura di sortaggio rispetto al seme di controllo.

Tabella 1. Effetto del sex-sorting e della conservazione sull'esocitosi acrosomiale degli spermatozoi di suino secondo la colorazione FITC-PNA/ PI.

Spermatozoi (%)	Controllo 0h	Sortati 0h	Controllo	Sortati
			24-26h	24-26h
Vivi- acrosoma intatto				
(PNA-/PI-)	80.2 ± 1.3 ^a	74.1 ± 1.7 ^a	77.6 ± 4.1 ^a	64.4 ± 2.2 ^b
Vivi- acrosoma reatto				
(PNA+/PI-)	1.3 ± 0.5	1.7 ± 0.5	1.5 ± 0.5	2.1 ± 1.1
Morti				
(PI+)	18.5 ± 1.1 ^a	24.2 ± 1.4 ^a	20.9 ± 3.9 ^a	33.5 ± 3.1 ^b

I dati sono indicati come media ± SEM di cinque replicati. I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa linea differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

D'altra parte, il seme sortato conservato per 24-26 ore a 15°C ha mostrato una riduzione significativa della percentuale di spermatozoi vivi con acrosoma intatto e un aumento del numero di cellule morte (PI+) rispetto agli altri gruppi mentre non sono stati registrati incrementi significativi del numero di spermatozoi vivi con acrosoma esocitato.

1.1.3 Immunolocalizzazione dell'Hsp70 e Western blotting

I risultati sull'immunolocalizzazione dell'Hsp70 sono presentati nella figura 7. La procedura di sessaggio ha indotto una riduzione significativa ($P < 0.05$) della percentuale di spermatozoi che mostrano il pattern non capacitato e un contemporaneo aumento delle cellule che presentano un pattern capacitato e di cellule che non presentano alcun segnale.

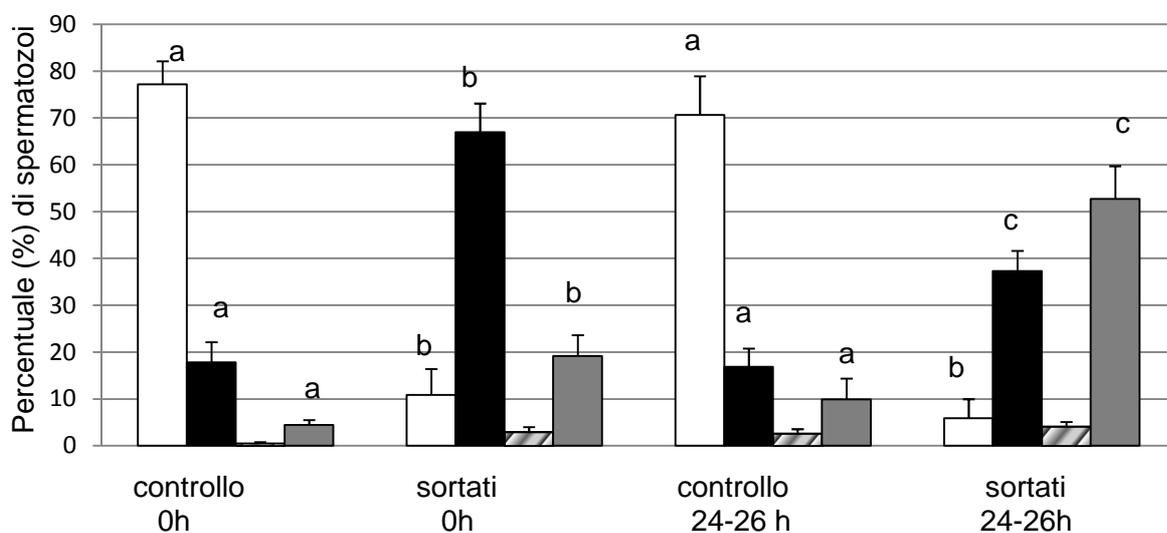


Fig. 8. Effetto del sex-sorting e della conservazione per 24-26 ore sulla percentuale di cellule spermatiche che mostrano differenti pattern di localizzazione dell'Hsp70: pattern non capacitato (barra bianca), pattern capacitato (barra nera), pattern reatto (barra a strisce) e cellule negative (barra grigia). Sono stati letti un minimo di 200 spermatozoi per ogni campione. I dati sono indicati come media \pm SEM di quattro replicati. Lettere diverse sullo stesso tipo di barre indicano differenze significative ($P < 0.05$).

Il seme di controllo conservato allo stato liquido per 24-26 ore non ha mostrato alcuna modificazione nella localizzazione dell'Hsp70 rispetto al controllo 0 h. La valutazione dell'immunolocalizzazione della Hsp70 negli spermatozoi sortati dopo 24-26 ore di conservazione a 15°C, ha rilevato una diminuzione significativa degli spermatozoi con pattern capacitato, rispetto al seme analizzato subito dopo la procedura di sortaggio ed un contemporaneo aumento ($P < 0.05$) delle cellule negative (nessun segnale) rispetto agli altri gruppi.

Per quanto riguarda il Western blotting (Fig. 8), il contenuto di Hsp70 (espresso in unità arbitrarie), sia nei campioni di seme sortato che nei campioni di seme di controllo conservato per 24-26 h non ha mostrato differenze significative rispetto agli spermatozoi di controllo 0 h, (131.5 ± 12.0 , 145.5 ± 15.5 , 117.7 ± 8.1 rispettivamente) mentre è stata registrata una diminuzione significativa del contenuto di Hsp70 negli spermatozoi sortati e conservati per 24-26 h (73.4 ± 11.5).

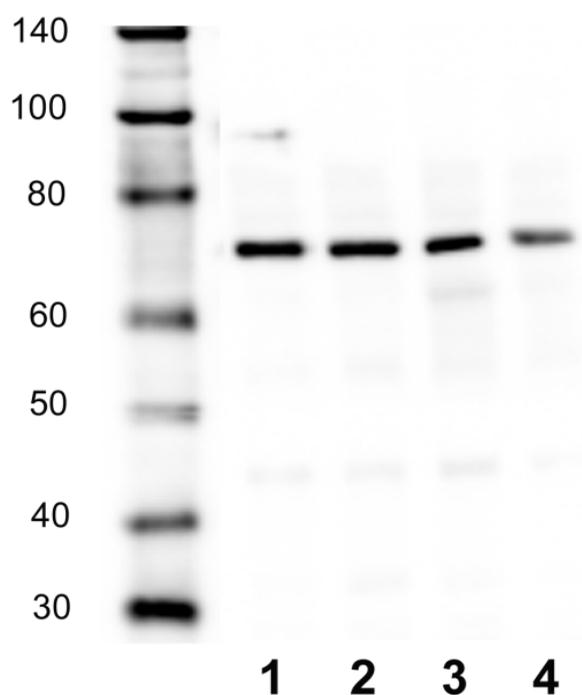


Fig. 9. Esempio di Western blot per l'Hsp70. Spermatozoi controllo non sortati (linea 1), sortati (linea 2), cellule spermatiche non sortate conservate per 24-26 h (linea 3) e sortate conservate per 24-26 ore (linea 4). I pesi molecolari standard (kDa) sono sulla sinistra.

1.2 Fecondazione in vitro

I risultati dell'IVF sono riassunti nelle tabelle 2 e 3. Quando gli oociti maturati *in vitro* sono stati incubati per un breve periodo di tempo (1 h) con un alto numero di spermatozoi (rapporto oocita/spermatozoi 1:5000) non sono state osservate differenze all'interno dello stesso giorno (sia a 0h che a 24 h) tra gli spermatozoi di controllo e gli spermatozoi sortati. Gli spermatozoi sortati conservati per 24-26 h hanno fatto rilevare una diminuzione significativa sia della percentuale di penetrazione che dell'efficienza totale dell'inseminazione rispetto al seme a 0h sia di controllo che sessato.

Tabella 2. Effetto della procedura di sortaggio e della conservazione sulla percentuale di penetrazione, sul tasso di normospermia e sull'efficienza totale della fecondazione di oociti maturati *in vitro* coincubati per 1 h con un rapporto oocita/ spermatozoi 1: 5000.

	Controllo 0h	Sortati 0h	Controllo 24-26h	Sortati 24-26h
% di penetrazione ¹	62.0 ± 6.5 ^a	60.4 ± 6.3 ^a	41.6 ± 6.2 ^{ab}	26.7 ± 4.8 ^b
% di normospermia ²	76.1 ± 5.6	77.3 ± 8.8	83.8 ± 9.9	91.8 ± 3.7
% efficienza totale ³	44.7 ± 6.6 ^a	40.1 ± 2.4 ^a	34.2 ± 5.0 ^{ab}	25.0 ± 5.1 ^b

I dati sono indicati come media ± SEM di sette replicati. I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa linea differiscono in maniera significativa, P<0.05.

¹ numero di oociti penetrati/totale degli inseminati

² numero di oociti contenenti solo una testa spermatica o pronucleo maschile/ totale dei penetrati

³ oociti normospermici /totale degli inseminati

Quando la coincubazione tra i gameti è stata eseguita con un numero inferiore di spermatozoi per oocita (rapporto oocita/ spermatozoi 1: 100) per una durata complessiva di 5 ore, non sono stati registrati cambiamenti significativi nella percentuale di penetrazione e nell'efficienza totale dell'inseminazione ottenuta utilizzando spermatozoi di controllo e spermatozoi appena sortati, mentre, in seguito all'utilizzo di spermatozoi sortati e conservati per 24-26 ore, questi parametri hanno subito un calo significativo rispetto agli altri gruppi. Per quanto riguarda la percentuale di normospermia, non sono state registrate differenze tra i diversi gruppi in seguito all'utilizzo di entrambe le tecniche di fecondazione *in vitro*.

Tabella 3. Effetto della procedura di sortaggio e della conservazione sulla percentuale di penetrazione, sul tasso di normospermia e sull'efficienza totale della fecondazione di oociti maturati *in vitro* coincubati per 1 h con un rapporto oocita/ spermatozoi 1: 100.

	Controllo 0h	Sortati 0h	Controllo 24-26h	Sortati 24-26h
% di penetrazione ¹	42.5 ± 5.2 ^a	43.9 ± 2.3 ^a	45.8 ± 4.2 ^a	17.5 ± 3.9 ^b
% di normospermia ²	86.3 ± 4.8	86.6 ± 2.9	92.4 ± 2.7	97.2 ± 2.7
% efficienza totale ³	36.5 ± 6.1 ^a	39.3 ± 1.9 ^a	42.3 ± 3.3 ^a	17.0 ± 3.3 ^b

I dati sono indicati come media ± SEM di sette replicati. I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa linea differiscono in maniera significativa, P<0.05.

¹ numero di oociti penetrati/totale degli inseminati

² numero di oociti contenenti solo una testa spermatica – pronucleo maschile/ totale dei penetrati

³ oociti normospermici /totale degli inseminati

DISCUSSIONE ESPERIMENTO 1

La conservazione degli spermatozoi di suino sortati potrebbe rivelarsi di estrema importanza per il trasporto del seme dal sito di sortaggio alle femmine destinate ad essere fecondate, stimolando in questo modo il suo utilizzo su larga scala; bisogna però considerare che in questa specie l'applicazione della crioconservazione non ha raggiunto livelli soddisfacenti tali da garantire la produzione di seme suino congelato di buona qualità (Bathgate 2008, Bathgate et al., 2008). Per questo motivo il seme di verro, al termine della procedura di sortaggio, viene solitamente conservato allo stato liquido anche se è stato dimostrato come questi spermatozoi perdano rapidamente la capacità fecondante se viene ritardato il momento dell'inseminazione. Lo scopo di questo esperimento è stato quello di avere ulteriori dati sulle caratteristiche morfo-funzionali degli spermatozoi sortati e conservati allo stato liquido per un periodo di

24-26 ore. Parrilla et al. (2005), conservando gli spermatozoi sortati per 10 ore a 17°C, hanno registrato che la percentuale di cellule danneggiate subisce un incremento proporzionale al tempo di conservazione. In questo studio, utilizzando la colorazione SYBR green/PI, la percentuale di cellule vive ha subito un calo, anche se non drammatico, in seguito al passaggio attraverso il citofluorimetro e un'ulteriore diminuzione dopo il periodo di conservazione. La riduzione della percentuale di cellule vive da noi rilevata dopo la conservazione allo stato liquido per 24-26 ore è risultata più evidente per gli spermatozoi sortati rispetto a quelli di controllo, confermando come la procedura di sortaggio sembri accrescere la sensibilità del gamete maschile alla conservazione. I nostri risultati sulla vitalità delle cellule spermatiche sono in accordo con quelli riportati da Garcia et al. (2007) sull'integrità di membrana degli spermatozoi sortati e valutati dopo 16-18 h di conservazione, se si tiene in considerazione il tempo più lungo di conservazione (24-26h) da noi utilizzato. Garcia et al. (2007) hanno però ottenuto una percentuale più alta di vitalità utilizzando, per riconcentrare il seme dopo il sortaggio, la tecnica della sedimentazione piuttosto che la centrifugazione; in questo modo hanno dimostrato l'effetto benefico della sedimentazione sulle cellule spermatiche, anche se in letteratura sono stati riportati dati contrastanti circa il numero di spermatozoi che si possono ottenere mediante questa metodica (Risopatron et al., 1995).

Un parametro importante per predire la capacità fecondante del seme è la valutazione dello stato dell'acrosoma delle cellule spermatiche vive, poiché solo gli spermatozoi di suino con gli acrosomi intatti sono in grado di legarsi e penetrare attraverso la zona pellucida (Fazeli et al., 1997); per questa ragione, una reazione acrosomiale prematura rende lo spermatozoo incapace di fecondare l'oocita. In questo esperimento né il sortaggio né la conservazione hanno indotto un aumento significativo della percentuale di cellule vive con esocitosi acrosomiale valutata mediante la colorazione FITC-PNA/PI. Un aumento della percentuale di positività alla lectina è stato invece evidenziato nella popolazione di cellule morte (PI positive) (dati non riportati). L'aumento della positività alla PNA in questa popolazione

spermatociti è probabilmente dovuto al danneggiamento delle membrane cellulari piuttosto che ad una reazione acrosomiale prematura. Come è stato già osservato da Spinaci et al. (2006), la procedura di sortaggio è in grado di provocare la rilocalizzazione dell'Hsp70 verso i pattern tipici degli spermatozoi capacitati, ma con il Western blotting non è stato evidenziato alcun consumo di questa proteina in seguito all'intera procedura. Tuttavia i campioni sortati e conservati per 24-26 ore hanno mostrato un aumento del numero delle cellule negative all'Hsp70, come è stato osservato mediante l'immunofluorescenza, e un calo del contenuto di questa proteina, come è stato evidenziato con il Western blotting. Una ipotesi per giustificare questi risultati potrebbe essere il consumo di questa chaperonina da parte degli spermatozoi nel tentativo di mantenere la giusta conformazione proteica in seguito agli stress provocati sia dalla procedura di sortaggio che dalla conservazione allo stato liquido; infatti l'Hsp70 sembra rivestire un ruolo protettivo contro gli stress aiutando il ripiegamento, il trasporto e l'assemblaggio delle proteine (Gething e Sambrook, 1992; Santoro, 2000). Poiché le Hsp degli spermatozoi vengono probabilmente sintetizzate solo durante la spermatogenesi, prima che avvenga la condensazione della cromatina, le cellule spermatocitarie non possono rispondere allo stress aumentando l'espressione di queste proteine ma possono solamente utilizzare le Hsp provenienti dal pool già sintetizzato.

Per quanto riguarda le prove di fecondazione, la procedura di sortaggio non ha influenzato in maniera negativa la competenza funzionale degli spermatozoi, la cui percentuale di penetrazione e l'efficienza totale dell'inseminazione sono risultate simili a quelle ottenute utilizzando il seme di controllo. Questi risultati combaciano con i dati ottenuti in un precedente lavoro (Spinaci et al., 2005), in cui, dopo l'IVF, sono state ottenute percentuali simili di blastocisti derivanti da inseminazioni con seme sortato e seme di controllo.

Nelle prove di fecondazione di questa ricerca sono state utilizzate le stesse concentrazioni di seme per gli spermatozoi sortati e non sortati, mentre altri autori

(Rath et al., 1999) hanno utilizzato per la fecondazione *in vitro* un numero dimezzato di spermatozoi sortati rispetto al controllo allo scopo di raggiungere percentuali simili di oociti normospermici. La percentuale di normospermia ottenuta nell'esperimento 1, utilizzando spermatozoi sessati e di controllo, è risultata simile; si può ipotizzare che il plasma seminale (2%) aggiunto al tubo di raccolta abbia un effetto stabilizzante sulla membrana plasmatica, e sia inoltre in grado di invertire lo stato di capacitazione acquisito dagli spermatozoi durante il passaggio attraverso il citofluorimetro (Maxwell et al., 1998).

Inoltre, i risultati ottenuti confermano come gli spermatozoi sortati, durante la conservazione, perdano progressivamente la capacità fecondante, poiché è stato registrato, dopo l'utilizzo di seme sortato conservato per 24-26 h, un calo dell'efficienza totale dell'inseminazione e della percentuale di penetrazione. Anche Parilla et al. (2005) hanno riportato una diminuzione della percentuale di fecondazione evidente in maniera significativa già dopo 5 ore di conservazione allo stato liquido. Dai risultati da noi ottenuti in questo esperimento, il seme sortato, in seguito ad un periodo di conservazione di 24-26 ore, ha mantenuto un certo grado di capacità fecondante *in vitro* che è risultata significativamente inferiore a quella ottenuta utilizzando seme appena sortato. Inoltre, quando la coincubazione tra i gameti è stata eseguita con un rapporto oocita:spermatozoi di 1:100 per una durata di 5 ore, è stata registrata una differenza significativa sia della percentuale di penetrazione che dell'efficienza totale dell'inseminazione in seguito all'utilizzo di seme sortato rispetto a quello di controllo, entrambi conservati allo stato liquido per 24-26 ore. Queste differenze, infatti, non sono state evidenziate nella prima serie di inseminazioni eseguite incubando i gameti per 1 ora ed usando un rapporto oocita:spermatozoi di 1:5000. Questi risultati possono essere probabilmente giustificati dal fatto che l'utilizzo di un numero così alto di spermatozoi per oocita può aver mascherato l'influenza della procedura di sortaggio sulla perdita della capacità fecondante degli spermatozoi conservati allo stato liquido. Il tasso di penetrazione ottenuto *in vitro* con gli spermatozoi sortati dopo 24-26 ore di

conservazione non sono così alti come quelli ottenuti da Garcia et al. (2007) i quali hanno utilizzato, eseguendo inseminazioni laparoscopiche, spermatozoi sortati conservati per 16-18 h in presenza di plasma seminale o degli eterodimeri PSP-I/PSP-II. Questa discrepanza potrebbe essere stata provocata dal prolungamento del periodo di conservazione del seme fino a 24-26 ore e dall'utilizzo di un numero inferiore di spermatozoi per mantenere un'alta percentuale di normospermia *in vitro* a scapito della percentuale di penetrazione. Si deve inoltre sottolineare come Garcia et al. (2007) siano stati in grado di raggiungere una bassa percentuale di polispermia grazie all'effetto modulatore dell'ambiente oviduttale sul processo fecondativo *in vivo*. Una correlazione positiva tra i livelli di Hsp70 e la qualità del seme è stata descritta nella specie suina da Huang et al. (2000). Inoltre in uno studio precedente Spinaci et al. (2005) hanno osservato come la presenza nel medium di fecondazione di un anticorpo anti-Hsp70 sia efficace nel ridurre, in modo dose-dipendente, la percentuale di fecondazione ottenuta utilizzando oociti con zona pellucida e senza zona; per questo motivo questo dato può essere indicativo di un possibile ruolo di questa proteina nell'interazione tra i gameti. Sulla base di queste osservazioni e dei risultati ottenuti in questo esperimento si può quindi ipotizzare che la riduzione dei livelli di Hsp70 e l'aumento del numero di cellule negative, osservati negli spermatozoi conservati per 24-26 ore post-sorting, possono contribuire, almeno in parte, al progressivo calo della capacità fecondante degli spermatozoi sessati.

Per concludere, la conservazione per 24-26 ore degli spermatozoi sortati, sebbene non sia capace di indurre una spontanea reazione acrosomiale, riduce la vitalità, il contenuto di Hsp70 e la capacità fecondante delle cellule spermatiche. Il meccanismo mediante il quale la procedura di sortaggio e la conservazione allo stato liquido provocano questi danni agli spermatozoi di verro devono essere ulteriormente approfonditi. Infatti una profonda conoscenza delle modificazioni indotte da queste procedure sulle cellule spermatiche, potrebbe rivelarsi importante allo scopo di minimizzare i danni che compromettono la fertilità e la funzionalità degli

spermatozoi di verro e stimolare l'applicazione sul campo di queste tecnologie nella specie suina.

ESPERIMENTO 2

2.1 Effetto degli antiossidanti sugli spermatozoi colorati e sortati

Allo scopo di valutare l'effetto dell'aggiunta degli antiossidanti sugli spermatozoi colorati con l'Hoechst 33342 per 1h a 35°C, i campioni sono stati diluiti fino ad ottenere una concentrazione di 1×10^8 spz/ ml e suddivisi in sei aliquote: (1) controllo (spermatozoi solo diluiti); (2) falsi colorati (spermatozoi non colorati ma riscaldati 1 h a 35°C); (3) spermatozoi colorati con Hoechst 33342; (4) aggiunta di epigallocatechina-3-gallato (EGCG) (40 µg/ ml) durante la colorazione; (5) aggiunta di Na piruvato (Na Pyr) (1 mM) + catalasi (Cat) (15 UI/ml) durante la colorazione; (6) aggiunta della superossido dismutasi (SOD) (375 UI/ml) durante la colorazione. Le concentrazioni di EGCG, NaPyr+Cat e SOD sono state scelte in base ai dati indicati in letteratura (Roca et al. 2005; Spinaci et al., 2008).

Dopo l'incubazione con Hoechst sono stati valutati i seguenti parametri: integrità della membrana plasmatica, integrità acrosomiale, attivazione delle caspasi e immunolocalizzazione dell'Hsp70.

Al fine di valutare l'effetto degli antiossidanti sulle cellule spermatiche durante la colorazione e il sortaggio, gli stessi campioni sono stati sottoposti alla procedura di sortaggio e quindi sono stati esaminati gli stessi parametri.

2.2 Effetto dell'aggiunta di sostanze antiossidanti con o senza plasma seminale sugli spermatozoi sortati e conservati per 24 h a 15°C

Per determinare l'efficacia dell'azione delle sostanze antiossidanti e/o del plasma seminale sugli spermatozoi sortati e conservati per 24 ore allo stato liquido, il seme di suino, una volta terminato il processo di sortaggio, è stato risospeso in Androhep^{TM®} e

frazionato in 8 gruppi: (1) seme conservato senza alcun supplemento; (2) EGCG; 40µg/ml (3) NaPyr (1mM) + Cat (15UI/ml); (4) SOD 375 UI/ml; (5) 1% plasma seminale (PS); (6) EGCG 40µg/ml + 1% PS; (7) + NaPyr (1mM) + Cat (15UI/ml) + 1% PS; (8) SOD (375 UI/ml) + 1%PS. Le aliquote sono state conservate per 24 ore a 15°C. Dopo questo periodo sono state valutate l'integrità della membrana plasmatica, l'integrità acrosomiale, l'attivazione delle caspasi e l'immunolocalizzazione dell'Hsp70.

ANALISI STATISTICA ESPERIMENTO 2

I dati sono presentati come media ± SEM; tutte le prove sono state ripetute almeno cinque volte. I dati sono stati analizzati con una ANOVA ad una via. Quando l'ANOVA ha rilevato una differenza significativa, i valori sono stati confrontati usando il test LSD e il livello di significatività è stato settato a $P < 0.05$. È stato utilizzato il software Macintosh SPSS 11.

RISULTATI ESPERIMENTO 2

2.1 Effetto degli antiossidanti sugli spermatozoi colorati e sortati di suino

2.1.1 Integrità membrana plasmatica

I risultati sull'integrità della membrana plasmatica degli spermatozoi di verro in seguito all'aggiunta o meno degli antiossidanti durante la fase di colorazione con l'Hoechst 33342 sono riportati nella tabella n. 4. I risultati riguardanti gli effetti delle sostanze antiossidanti aggiunte sia durante la colorazione che durante il passaggio attraverso il citofluorimetro sono riassunti nella tabella n. 5. La percentuale di cellule spermatiche vive ha subito una diminuzione significativa ($P < 0.05$) dopo 1 h di incubazione a 35°C rispetto al seme di controllo. L'aggiunta del colorante fluorescente Hoechst 33342 non ha ulteriormente diminuito il numero delle

cellule vive, mentre l'aggiunta degli antiossidanti (NaPyr+Cat, EGCG, SOD) non ha apportato miglioramenti alla percentuale di cellule spermatiche vitali rispetto ai campioni colorati senza la presenza di queste sostanze. La vitalità degli spermatozoi sortati è risultata significativamente più bassa ($P < 0.05$) rispetto a quella degli spermatozoi di controllo.

2.1.2 Integrità acrosomiale

I risultati riguardanti le percentuali di integrità acrosomiale degli spermatozoi sottoposti a colorazione e all'intera procedura di sortaggio in presenza o assenza di sostanze antiossidanti sono riportati rispettivamente nelle Tabelle 4 e 5.

Tabella 4. Percentuali medie (\pm SEM) delle cellule spermatiche con membrana plasmatica integra (colorazione SYBR Green/PI) e acrosoma intatto (colorazione PSA) dopo la colorazione in presenza o meno degli antiossidanti.

Trattamento	% integrità di membrana	% integrità acrosomiale
Controllo (seme fresco non colorato)	81.1 \pm 1.4 ^a	93.8 \pm 1.5
Incubati senza colorante	73.5 \pm 2.4 ^b	90.8 \pm 1.4
Colorati	67.2 \pm 2.4 ^{bc}	88.7 \pm 2.3
Colorati+ EGCG	62.7 \pm 1.9 ^c	89.7 \pm 2.6
Colorati + NaPyr + Cat	63.2 \pm 3.2 ^c	88.8 \pm 2.9
Colorati + SOD	63.5 \pm 2.5 ^c	90.7 \pm 2.4

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa colonna differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

Non sono state riscontrate differenze significative tra i campioni di controllo e quelli analizzati in seguito alla colorazione con Hoechst o alla completa procedura di sessaggio.

Tabella 5. Percentuali media (\pm SEM) delle cellule vitali (colorazione SYBR Green/PI), degli spermatozoi con acrosomi intatti (colorazione PSA) dopo l'intera procedura di sortaggio con o senza gli antiossidanti.

Trattamento	%integrità di membrana	% integrità acrosomiale
Controllo (seme fresco non sortato)	84.2 \pm 1.3 ^a	96.2 \pm 0.9
Sortati	75.5 \pm 2,2 ^b	96 \pm 0.9
Sortati + EGCG	74.3 \pm 2.8 ^b	95.8 \pm 0,9
Sortati + NaPyr+Cat	73.5 \pm 2.1 ^b	94.3 \pm 1,4
Sortati+SOD	69.4 \pm 2.3 ^b	94.1 \pm 1,1

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa colonna differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

2.1.3 Attivazione delle caspasi

I risultati che riguardano l'attivazione delle caspasi sono riassunti nelle Tabelle 6 e 7. Gli spermatozoi di suino positivi alla colorazione FITC-VAD-FMK hanno mostrato un segnale molto forte a livello della coda che può in alcuni casi essere accompagnato da una leggera positività a livello della testa.

Sono stati identificati 4 pattern:

- cellule vive (FITC-VAD-FMK negative/PI negative);
- cellule vive con caspasi attive (FITC-VAD-FMK positive/ PI negative);
- cellule morte (FITC-VAD-FMK negative/PI positive);
- cellule morte con caspasi attive (FITC-VAD-FMK positive/ PI positive).

Dopo la colorazione non sono state evidenziate differenze significative della percentuale di spermatozoi con caspasi attivate tra i gruppi analizzati; è stato registrato un aumento delle cellule FITC-VAD-FMK positive/PI positive nei campioni di seme incubati per 1 h a 35°C con o senza il colorante Hoechst 33342 rispetto al seme fresco di controllo. L'aggiunta delle sostanze antiossidanti durante l'incubazione con il colorante non ha esercitato effetto benefico sul seme.

Tabella 6. Percentuali medie (\pm SEM) degli spermatozoi vivi o morti con caspasi attivate o meno dopo la colorazione in presenza o assenza degli antiossidanti.

Trattamento	% Vivi	% Vivi: Caspasi +	% Morti	% Morti: Caspasi +
Controllo	66.2 \pm 2.6 ^a	0.7 \pm 0.3	19 \pm 2.7	14.2 \pm 2.8 ^a
Incubati senza colorante	57.2 \pm 5.2 ^{ab}	1 \pm 0.6	18.5 \pm 4.4	23.3 \pm 2.2 ^b
Colorati	56 \pm 2.9 ^{ab}	0.5 \pm 0.4	18 \pm 3.2	25.6 \pm 1.4 ^b
Colorati + EGCG	59.6 \pm 2.3 ^{ab}	0.9 \pm 0.4	14.3 \pm 3.5	25.2 \pm 2.4 ^b
Colorati + NaPyr+Cat	53.6 \pm 8.3 ^{ab}	0.4 \pm 0.3	19.6 \pm 8.7	26.5 \pm 3.6 ^b
Colorati + SOD	52.3 \pm 4.9 ^b	0.7 \pm 0.2	17.7 \pm 5.1	29.3 \pm 2.5 ^b

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa colonna differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

Dopo la procedura di sortaggio, è stato registrato un aumento significativo ($P < 0.05$) degli spermatozoi FITC-VAD-FMK positivi/PI positivi rispetto al seme di controllo, indipendentemente dall'aggiunta degli antiossidanti.

Tabella 7. Percentuali medie (\pm SEM) degli spermatozoi vivi o morti con caspasi attivate o meno dopo la colorazione e il passaggio attraverso il citofluorimetro in presenza o assenza degli antiossidanti.

Trattamento	% Vivi	% Vivi: Caspasi +	% Morti	% Morti : Caspasi +
Controllo (seme fresco non sortato)	72.1 \pm 3.8 ^a	0.3 \pm 0.6	13.7 \pm 2	13.8 \pm 3.5 ^a
Sortato	51.5 \pm 9.4 ^{ab}	0.5 \pm 0.5	25 \pm 3.5	23 \pm 8.2 ^b
Sortato + EGCG	52.2 \pm 8.9 ^{ab}	0.5 \pm 0.3	22.2 \pm 6.8	26 \pm 1.7 ^b
Sortato + NaPyr+Cat	60.2 \pm 7.5 ^{ab}	1.5 \pm 1.5	18.3 \pm 6.5	20.1 \pm 2 ^b
Sortato + SOD	45.6 \pm 7.9 ^b	1.5 \pm 1.3	28.5 \pm 5.4	24.4 \pm 5.4 ^b

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa colonna differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

2.1.4 Immunolocalizzazione dell'Hsp70

I risultati che riguardano l'immunolocalizzazione dell'Hsp70 negli spermatozoi fissati con metanolo/acetone dopo la colorazione e il sortaggio sono riportati nelle Tabelle 8 e 9. Dopo colorazione con l'Hoechst 33342 è stata osservata una riduzione del numero di spermatozoi di suino con pattern non capacitato ed un incremento parallelo delle cellule presentanti il pattern capacitato rispetto ai campioni di controllo. La presenza degli antiossidanti durante l'incubazione con il colorante, non ha indotto variazioni significative delle percentuali di spermatozoi appartenenti ai tre pattern di localizzazione individuati, in confronto alle percentuali ottenute analizzando gli spermatozoi colorati senza l'aggiunta degli antiossidanti.

Tabella 8. Media delle percentuali (\pm SEM) degli spermatozoi di suino che mostrano pattern differenti di localizzazione dell'Hsp70 (non capacitato, capacitato, reatto o negativo) dopo la colorazione in presenza o meno delle sostanze antiossidanti.

Trattamento	% Pattern non capacitato	% Pattern capacitato	% Pattern reatto	% Negativi
Controllo(seme fresco non colorato)	74.5 \pm 1.3 ^a	20 \pm 1.6 ^a	0.6 \pm 0.3 ^a	4.9 \pm 0.9 ^a
Incubato senza colorante	52 \pm 5.5 ^{ab}	41.1 \pm 5.5 ^{ab}	1.6 \pm 0.6 ^{ab}	5.3 \pm 1.4 ^a
Colorato	41 \pm 10.9 ^b	46 \pm 9.8 ^b	4.1 \pm 1.3 ^{ab}	9 \pm 2.2 ^{ab}
Colorato + EGCG	48 \pm 12.1 ^b	35 \pm 10.1 ^{ab}	5.1 \pm 1.8 ^b	11.9 \pm 0.9 ^{bc}
Colorato + NaPyr+Cat	33.1 \pm 7.6 ^b	47.1 \pm 9.1 ^b	4.3 \pm 1.6 ^b	15.5 \pm 3.1 ^c
Colorato + SOD	34.3 \pm 8.1 ^b	47.4 \pm 7.6 ^b	5 \pm 1 ^b	13.4 \pm 2.2 ^{bc}

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa colonna differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

Dopo la procedura di sortaggio (Tab. 9), confrontando i risultati con quelli ottenuti nelle cellule spermatiche non sortate, si è evidenziato una diminuzione significativa della percentuale di spermatozoi con pattern non capacitato, un aumento delle cellule con il pattern capacitato e degli spermatozoi con nessun segnale (negativi). L'azione delle sostanze antiossidanti durante la colorazione e la procedura di sortaggio si è rivelata incapace di prevenire le modificazioni dei pattern dell'Hsp70.

Tabella 9. Media delle percentuali (\pm SEM) degli spermatozoi di suino che mostrano pattern differenti di localizzazione dell'Hsp70 (non capacitato, capacitato, reatto o negativo) dopo la colorazione e il sortaggio in presenza o in assenza di sostanze antiossidanti. I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa colonna differiscono in maniera significativa, $P < 0.05$.

Trattamento	% Pattern non capacitato	% Pattern capacitato	% Pattern reatto	% Negativi
Controllo (seme fresco non sortato)	76.1 \pm 3.2 ^a	19.3 \pm 3.4 ^a	0.3 \pm 0.3	4.4 \pm 0.6 ^a
Sortato	15.1 \pm 7.6 ^b	65.3 \pm 11.5 ^b	1.2 \pm 0.8	18.5 \pm 3.4 ^b
Sortato + EGCG	22.9 \pm 1.3 ^b	55.7 \pm 3.5 ^b	3.3 \pm 2.6	18.1 \pm 2.9 ^b
Sortato + NaPyr+Cat	19.9 \pm 6.9 ^b	58.4 \pm 4.1 ^b	1 \pm 0.5	20.7 \pm 2.6 ^b
Sortato +SOD	13.9 \pm 7.7 ^b	63.5 \pm 9.5 ^b	4.2 \pm 1.7	18.4 \pm 3.9 ^b

2.2 Effetto dell'aggiunta di sostanze antiossidanti con o senza plasma seminale sugli spermatozoi sortati e conservati per 24

2.2.1 Integrità della membrana plasmatica

I dati sull'integrità di membrana degli spermatozoi sortati e conservati 24 h a 15°C sono riportati nella Tabella 10. La conservazione allo stato liquido del seme sortato ha ridotto in maniera significativa ($P < 0.05$) la percentuale di cellule vive. Tuttavia, dopo 24 h di conservazione, è stato riportato un aumento significativo ($P < 0.05$) della vitalità nei campioni di seme in cui erano stati aggiunti SOD o EGCG e plasma seminale, rispetto ai campioni di seme sortato conservati senza alcun supplemento. Inoltre è stata evidenziata la tendenza dei campioni conservati con plasma seminale e antiossidanti a presentare una percentuale più alta di cellule spermatiche vive rispetto ai corrispettivi campioni conservati in presenza delle sole sostanze antiossidanti.

2.2.2 Integrità acrosomiale

I risultati sull'integrità dell'acrosoma delle cellule spermatiche sortate conservate 24 h con antiossidanti e/o plasma seminale sono riportate nella Tabella 10. Dopo il periodo di conservazione di 24 h, è stato evidenziato una calo significativo della percentuale di spermatozoi presentanti acrosoma intatto. L'aggiunta delle sostanze antiossidanti non ha apportato alcun miglioramento alla percentuale di integrità acrosomiale.

Tabella 10. Effetto degli antiossidanti e del plasma seminale sull'integrità di membrana (colorazione SYBR-Green /PI) e sull'integrità acrosomiale (colorazione PSA) degli spermatozoi sortati e conservati per 24 h a 15°C.

Trattamento	% integrità di membrana	% integrità acrosomiale
Controllo (seme sortato 0h)	75.5 ± 2.2 ^a	96.5 ± 1 ^a
Conservato	51.6 ± 2.1 ^b	81.5 ± 4.3 ^b
Conservato + NaPyr+Cat	53.7 ± 1.7 ^{bc}	79.7 ± 2.7 ^b
Conservato + EGCG	50.3 ± 1.7 ^b	74.8 ± 1.5 ^b
Conservato + SOD	52.2 ± 1.9 ^b	81 ± 6.7 ^b
Conservato + SP	55 ± 2 ^{bc}	80.6 ± 5 ^b
Conservato + SP + NaPyr+Cat	55.4 ± 1.7 ^{bc}	77.3 ± 2.2 ^b
Conservato + SP + EGCG	58.2 ± 1.9 ^c	77.1 ± 2.5 ^b
Conservato+ SP + SOD	58.7 ± 1.6 ^c	80.4 ± 3.4 ^b

I valori che presentano apici diversi all'interno della stessa linea differiscono in maniera significativa, P<0.05.

2.2.3 Attivazione delle caspasi

Non sono state registrate differenze significative nelle percentuali di spermatozoi vivi con o senza caspasi attivate tra i diversi gruppi analizzati (Tab. 11).

Gli antiossidanti non sono stati in grado di indurre un calo del numero degli spermatozoi vivi con caspasi attive (FITC-VAD-FMK positivo/PI negativo). I campioni addizionati con l'antiossidante EGCG, sia in presenza che in assenza del plasma seminale, hanno mostrato una riduzione della percentuale di cellule morte

FITC-VAD-FMK positive rispetto ai campioni di seme sortato e conservato senza alcuna integrazione.

Tabella 11. Effetto degli antiossidanti e del plasma seminale sulla percentuale di spermatozoi vivi o morti con caspasi attivate o meno dopo 24 ore di conservazione a 15°C post *sorting*

Trattamento	% Vivi	% Vivi: Caspasi +	% Morti	% Morti : Caspasi +
Controllo (seme sortato 0 h)	51.5 ± 9.4	0.5 ± 0.5	25.1 ± 3.5 ^{ab}	23 ± 8.2 ^{ab}
Conservato	50 ± 4.9	2 ± 1.2	15.7 ± 5 ^b	32.3 ± 2.4 ^b
Conservato + NaPyr+Cat	48.3 ± 2.5	2.2 ± 1.3	21.9 ± 3.3 ^{ab}	27.7 ± 1.8 ^{bd}
Conservato + EGCG	53.6 ± 9.6	0.5 ± 0.5	31.3 ± 9.5 ^a	14.6 ± 0.6 ^{ac}
Conservato + SOD	51 ± 5.8	0.7 ± 0.4	25.7 ± 5.3 ^{ab}	22.6 ± 0.8 ^{ab}
Conservato +SP	57.5 ± 6	0.7 ± 0.5	19.5 ± 2.2 ^{ab}	22.4 ± 4.2 ^{ab}
Conservato + SP + NaPyr+Cat	56.6 ± 4.8	1.2 ± 0.7	15.9 ± 2.7 ^b	26.3 ± 3.5 ^{bd}
Conservato + SP + EGCG	56 ± 5.2	0.2 ± 0.2	25.6 ± 2.7 ^{ab}	18.2 ± 2.9 ^{acd}
Conservato + SP + SOD	47 ± 3.6	1.3 ± 0.6	26 ± 4.4 ^{ab}	25.8 ± 1.7 ^{bd}

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa linea differiscono in maniera significativa, P<0.05.

2.2.4 Immunolocalizzazione dell'Hsp70

La Tabella 12 mostra i risultati dell'immunolocalizzazione dell'Hsp70 sulle cellule spermatiche sortate e conservate con o senza antiossidanti e/o plasma seminale. L'immunofluorescenza effettuata sugli spermatozoi sortati fissati in metanolo/acetone dopo 24 ore di conservazione a 15°C, non ha evidenziato alcuna modificazione della percentuale di cellule presentanti il pattern non capacitato. D'altra parte, è stata registrata una diminuzione del numero di spermatozoi con pattern capacitato ed un aumento parallelo delle cellule caratterizzate dalla perdita del segnale fluorescente rispetto ai campioni analizzati subito dopo aver subito la procedura di sortaggio.

L'aggiunta di sostanze antiossidanti non è stato in grado di prevenire i cambiamenti di localizzazione della chaperonina.

Tabella 12. Effetto degli antiossidanti e del plasma seminale sulle percentuali di spermatozoi sortati che mostrano differenti pattern di localizzazione dell'Hsp70 (non capacitato, capacitato, reatto o negativo) dopo 24 h di conservazione a 15°C.

Trattamento	% Pattern non capacitato	% Pattern capacitato	% Pattern reatto	% Negativo
Controllo (sortato 0 h)	11,6 ± 4,6	70,6 ± 4,5 ^a	2,7 ± 1,1 ^a	15,1 ± 1,3 ^a
Conservato	11,8 ± 4,2	33 ± 5,1 ^b	3,2 ± 1 ^{ab}	52 ± 5,2 ^b
Conservato + NaPyr+Cat	12,6 ± 5,4	30,2 ± 2,5 ^b	4,4 ± 1,2 ^{abc}	52,8 ± 4,5 ^b
Conservato+ EGCG	15,7 ± 5,7	35,8 ± 4,8 ^b	4,7 ± 1,9 ^{abc}	43,8 ± 6,1 ^b
Conservato+ SOD	10 ± 6,4	31,6 ± 4 ^b	4,2 ± 1,3 ^{abc}	54,2 ± 6,4 ^b
Conservato+SP	10,8 ± 3,3	32,7 ± 2,4 ^b	7,4 ± 2 ^{bc}	49,2 ± 6,4 ^b
Conservato+ SP + NaPyr+Cat	11,2 ± 4,3	34,3 ± 2 ^b	7,6 ± 2 ^c	47 ± 5,7 ^b
Conservato+ SP + EGCG	9 ± 2,9	41,2 ± 5,9 ^b	8,2 ± 1,9 ^c	41,7 ± 6 ^b
Conservato + SP + SOD	17,1 ± 4,5	33 ± 3,6 ^b	7,2 ± 1,1 ^{bc}	42,8 ± 6,6 ^b

I valori che presentano lettere diverse all'interno della stessa linea differiscono in maniera significativa, P<0.05.

DISCUSSIONE ESPERIMENTO 2

In questo secondo esperimento è stato valutato l'effetto dell'aggiunta di sostanze antiossidanti durante le differenti fasi previste dalla procedura di sortaggio, allo scopo di ridurre e di minimizzare l'effetto dannoso dello stress ossidativo sulla qualità del seme sortato e conservato allo stato liquido. L'incubazione di 1 h a 35°C ha indotto sulle cellule spermatiche un aumento del numero di cellule morte, mentre l'aggiunta del colorante fluorescente Hoechst 33342 non ha ulteriormente influenzato la vitalità del seme. Quindi la diminuzione della vitalità sembra essere probabilmente causata dall'aumento della temperatura e dalla diluizione del seme piuttosto che dall'azione diretta del colorante fluorescente sulle cellule spermatiche. Questi risultati sono diversi da quelli ottenuti da Vazquez et al. (2002), i quali non hanno osservato differenze nella motilità e nella capacità fecondante degli spermatozoi di suino dopo incubazione con il colorante Hoechst 33342, alla concentrazione solitamente utilizzata per il sortaggio, mentre sono comparabili con quelli ottenuti da Maxwell et al. (1998), i quali hanno invece registrato una diminuzione della vitalità e della motilità indotti dal riscaldamento in presenza del colorante; anche Spinaci et al. (2006) hanno evidenziato una riduzione significativa della vitalità delle cellule spermatiche di verro dopo 1 h di incubazione con Hoechst rispetto alle cellule di controllo.

I campioni, incubati per 1 h a 35°C sia in assenza che in presenza del colorante, non hanno mostrato alterazioni del numero di spermatozoi con le caspasi attivate e con gli acrosomi intatti rispetto al controllo, mentre hanno mostrato modificazioni della localizzazione della heat shock protein 70. L'Hsp 70 è una chaperonina coinvolta nel mantenimento della corretta conformazione proteica, nella stabilizzazione dei precursori proteici non ripiegati, negli spostamenti delle proteine e nella loro translocazione attraverso la membrana (Gething e Sambrook, 1992). Oltre alla funzione protettiva contro gli agenti stressanti, questa proteina sembra ricoprire un ruolo essenziale nella capacità dello spermatozoo di fecondare l'oocita mediante la

sua rilocalizzazione in seguito alla capacitazione e alla reazione acrosomiale (Huang et al., 2000; Matwee et al., 2001; Spinaci et al., 2005b).

Per quanto riguarda la localizzazione dell'Hsp70, l'incubazione per 1 h a 35°C, con o senza colorante, ha indotto un aumento delle cellule spermatiche che presentavano il pattern capacitato; questa modificazione sembra quindi essere stata provocata dalla diluizione e dal riscaldamento piuttosto che dall'Ho 33342. Infatti variazioni di temperatura minime possono modificare in maniera considerevole lo stato fisico dei lipidi di membrana, i quali costituiscono un punto critico per il rimodellamento della membrana plasmatica (Yanagimachi, 1994). L'aggiunta delle sostanze antiossidanti (EGCG, SOD, Na Pyr + Cat) durante la coincubazione con il colorante, non ha sortito alcun effetto sulla vitalità, l'integrità acrosomiale, l'attivazione delle caspasi e la distribuzione dell'Hsp70 delle cellule spermatiche. Lo stress provocato dalla fase di colorazione e dal seguente processo di sortaggio ha ridotto la vitalità degli spermatozoi, ha aumentato il numero di cellule morte con le caspasi attivate, mentre non ha modificato in maniera significativa la percentuale di integrità acrosomiale. Come è stato già osservato da Spinaci et al. (2006) la procedura di sortaggio ha indotto una rilocalizzazione dell'Hsp70 verso i pattern che si manifestano tipicamente negli spermatozoi capacitati. Questa osservazione conferma l'induzione, da parte del processo di sortaggio, di cambiamenti a livello della cellula spermatica che alcuni autori (Maxwell e Johnson, 1997) hanno definito modificazioni simil-capacitative. Infatti il sortaggio sottopone gli spermatozoi a tassi di diluizione molto elevati che rimuovono quasi completamente alcune proteine che agiscono da fattori decapacitanti, gli antiossidanti naturali che sono importanti per la riduzione della produzione dei ROS e altri componenti essenziali presenti nel plasma seminale coinvolti nel preservare l'integrità morfo-funzionale delle cellule spermatiche (Maxwell e Johnson, 1999). Ad ogni modo, quando gli spermatozoi sono stati sottoposti all'azione stressante del sorting, nessuno degli antiossidanti utilizzati è stato in grado di migliorare i parametri qualitativi delle cellule spermatiche. Bisogna anche sottolineare che, utilizzando il protocollo previsto per sortare il seme suino,

abbiamo aggiunto il plasma seminale al fluido in cui gli spermatozoi sortati sono stati raccolti (catch fluid); questa integrazione potrebbe aver mascherato l'azione delle sostanze antiossidanti addizionate.

La conservazione allo stato liquido sembra favorire negli spermatozoi di suino dei pericolosi cambiamenti perossidativi e fenomeni simil-apoptotici che portano alla diminuzione della motilità e della vitalità, a modificazioni della permeabilità di membrana e anche ad un incremento del numero di cellule spermatiche con un basso potenziale di membrana mitocondriale (Kumaresan et al., 2009).

Dopo 24 h di conservazione, gli spermatozoi di verro sortati hanno mostrato un calo della percentuale di cellule con la membrana plasmatica integra rispetto al seme valutato subito dopo il sortaggio e l'aggiunta del plasma seminale ha condizionato, anche se non in maniera significativa, la vitalità delle cellule spermatiche sortate e conservate. Questi risultati concordano con quelli ottenuti da Parrilla et al. (2005), i quali hanno registrato un calo della vitalità e della motilità del seme sortato già dopo 10 h di conservazione a 18°C. L'aggiunta delle sole sostanze antiossidanti non ha indotto un aumento della percentuale di cellule vitali, tuttavia addizionando ai campioni di seme sortato il plasma seminale con l'EGCG o la SOD è stato registrato un aumento significativo della percentuale di cellule vive rispetto al seme sortato e conservato senza alcuna integrazione. Grazie a questo dato si può ipotizzare che l'azione di questi antiossidanti riesca ad amplificare l'effetto positivo che il plasma seminale esercita sulle cellule spermatiche sortate e conservate. Un'interazione positiva significativa tra il plasma seminale e un antiossidante (Vitamina E) è stata già riportata da Pèrez-Pè et al. (2001) durante la conservazione allo stato liquido di seme di ariete.

Dopo 24 ore di conservazione, non sono state osservate differenze, tra tutti i gruppi, nella percentuale di spermatozoi vivi con le caspasi attivate.

Tuttavia, il calo significativo del numero di cellule spermatiche sortate morte FITC-VAD-FMK positive, valutato dopo la conservazione in presenza di EGCG con o

senza il plasma seminale, può suggerirci un possibile coinvolgimento di questo antiossidante nel ridurre l'attivazione delle caspasi. Questi dati sono in accordo con lo studio eseguito da Katunuma et al. (2006) i quali hanno evidenziato il ruolo di inibitore specifico delle caspasi 3, 7 e 2 dell'EGCG durante l'induzione sperimentale del processo apoptotico. Per quanto riguarda l'integrità acrosomiale, nei campioni conservati per 24 ore è stata evidenziata una diminuzione della percentuale di cellule con acrosoma intatto se confrontate con il seme appena sortato. Questi risultati non sono completamente in accordo con quelli ottenuti nel primo esperimento, in cui non è stato osservato un incremento dell'esocitosi acrosomiale dopo 24-26 ore di conservazione del seme sortato. Queste discrepanze sono probabilmente dovute ai diversi metodi di colorazione usati: l'utilizzo in questo esperimento della PSA nelle cellule permeabilizzate permette l'individuazione di tutti gli spermatozoi con acrosoma danneggiato e non solo delle cellule spermatiche andate incontro spontaneamente alla reazione acrosomiale. Ciò, potrebbe costituire, almeno in parte, la ragione per la quale i nostri dati sono discordanti con quelli di Klinc et al. (2007). In questo esperimento, non abbiamo osservato gli effetti protettivi delle sostanze antiossidanti sull'integrità acrosomiale in seguito a conservazione post-sorting, mentre Klinc et al. (2007) hanno registrato una diminuzione significativa degli spermatozoi bovini vivi con acrosomi esocitati dopo conservazione a 15°C in presenza degli antiossidanti catalasi e Na Piruvato. Tuttavia, bisogna sottolineare come l'azione benefica degli antiossidanti sembri possedere una forte specificità. Nel nostro laboratorio sono stati effettuati ulteriori esperimenti (dati non pubblicati) in cui è emerso come l'EGCG abbia un effetto dannoso sugli spermatozoi sortati di bovino, mentre la SOD, il Na Piruvato e la catalasi siano in grado di migliorare i parametri qualitativi di queste cellule. In questo esperimento invece abbiamo osservato come gli spermatozoi di suino sortati siano sensibili all'azione benefica del plasma seminale associato a SOD o EGCG durante il periodo di conservazione, mentre il Na piruvato e la catalasi non siano stati in grado, neanche in

presenza del plasma seminale, di sortire un effetto protettivo sulle cellule spermatiche.

L'inefficacia dell'aggiunta di sodio piruvato e della catalasi nel prevenire il deterioramento delle caratteristiche qualitative delle cellule sortate di suino durante la conservazione, è stata registrata anche da Grossfeld (2007) il quale, addizionando l'Androhep con questi due sostanze antiossidanti e il mercaptoetanolo, non ha evidenziato nessun miglioramento della motilità e della morfologia degli spermatozoi analizzati 24 e 120 h post-sorting.

Gli spermatozoi sortati di suino dopo 24 ore di conservazione hanno mostrato una perdita del segnale fluorescente per l'Hsp70 osservata mediante l'immunofluorescenza. Questo dato lo abbiamo già evidenziato nel primo esperimento, dove abbiamo visto, mediante Western blotting, essere associato alla contemporanea diminuzione del contenuto di Hsp70. Abbiamo già detto che questa perdita potrebbe essere interpretata come una conseguenza del consumo di questa proteina indotto dallo stress ossidativo durante la procedura di sortaggio e il conseguente periodo di conservazione a 15°C. L'aggiunta degli antiossidanti, in assenza o in presenza del plasma seminale, non è stata sufficiente a ridurre la percentuale di spermatozoi con segnale negativo per l'Hsp70.

In conclusione, si può affermare che mentre la SOD e l'EGCG associati al plasma seminale sembrano avere un'azione compensatoria di protezione sugli spermatozoi conservati dopo il sortaggio, l'azione degli antiossidanti si è dimostrata inefficace a prevenire i danni indotti durante i primi step previsti dalla procedura di sortaggio. Ad ogni modo l'identificazione di sostanze antiossidanti in grado di avere un effetto protettivo sulle cellule spermatiche appartenenti a ciascuna specie è essenziale alla messa a punto di nuovi protocolli di sortaggio necessari al fine di migliorare le caratteristiche morfo-fisiologiche del seme sessato e minimizzare i danni ossidativi responsabili del crollo della capacità fecondante degli spermatozoi sortati e conservati.

ESPERIMENTO 3

3.1 Valutazione dei parametri qualitativi del seme di suino fresco e sortato conservato allo stato liquido o mediante incapsulazione.

In questo esperimento sono stati analizzati i seguenti quattro gruppi:

- (1) controllo (seme diluito 1:1 in AndrohepTM Minitub, Tiefenbach, Germany);
- (2) capsule (seme tal quale incapsulato);
- (3) sortato diluito (seme sessato e ripreso in AndrohepTM + plasma seminale omologo);
- (4) sortato capsule (seme sessato, ripreso in plasma seminale omologo e incapsulato).

La valutazione qualitativa degli spermatozoi appartenenti ai quattro gruppi è stata effettuata analizzando l'integrità di membrana e l'integrità acrosomiale al momento del prelievo del campione e dopo 24, 48 e 72 ore di conservazione. L'integrità di membrana è stata valutata anche a 144 ore dal momento del prelievo.

3.2 Valutazione della capacità fecondante del seme sortato di suino conservato allo stato liquido o incapsulato.

Il test di fecondazione *in vitro* è stato effettuato utilizzando spermatozoi sortati, sia conservati allo stato liquido che incapsulati, dopo 24, 48 e 72 ore di conservazione.

ANALISI STATISTICA ESPERIMENTO 3

Per valutare le percentuali di integrità di membrana (vitalità) e di integrità acrosomiale dei quattro gruppi di trattamento analizzati, (1- controllo; 2- capsule; 3- sortato capsule; 4- sortato diluito) è stata applicata una analisi della varianza (ANOVA) a 2 vie, considerando tempo e trattamento come fattori fissi e utilizzando il test di Tukey per confronti multipli. Il rischio espresso come Odds Ratio (OR) della fecondazione *in vitro* di ovociti, con materiale seminale sortato conservato allo stato

liquido o incapsulato, è stato valutato mediante regressione logistica (Poisson) a tre vie considerando il tempo di incubazione, il verro e il trattamento (incapsulazione) come variabili indipendenti. L'OR di un determinato fenomeno dicotomico (nel nostro caso la fecondazione dell'ovocita) è espresso, ad esempio, dal rapporto (frequenza relativa in cui il fenomeno si è verificato con materiale seminale incapsulato) / (frequenza relativa in cui il fenomeno si è verificato con materiale seminale non incapsulato). L'analisi di regressione logistica ha quindi permesso di valutare l'efficacia della tecnologia di incapsulazione nel favorire la fecondazione dell'ovocita, la normospermia o la polispermia (variabili risposta).

Un OR viene solitamente indicato come stima puntuale e come intervallo di confidenza al 95%; questo identifica un *range* di valori che includono anche il valore "reale", questo valore consente di verificare la significatività statistica dei risultati. Un intervallo di confidenza che contenga il valore 1 indica la medesima probabilità che la fecondazione dell'ovocita avvenga sia con seme incapsulato che con seme diluito, e come tale l'OR viene considerato non significativo.

Le variabili risposta, o variabili dipendenti, ottenute dall'analisi di regressione logistica sono 1) oociti non penetrati/oociti totali, 2) oociti polispermici/oociti totali, 3) oociti normospermici/oociti totali, 4) oociti penetrati/oociti totali, 5) oociti normospermici/oociti fecondati.

RISULTATI ESPERIMENTO 3

3.1 Valutazione dei parametri qualitativi del seme di suino fresco e sortato conservato allo stato liquido o mediante incapsulazione.

3.1.1 Integrità della membrana plasmatica (vitalità)

I risultati sull'integrità della membrana plasmatica degli spermatozoi di controllo e sortati conservati allo stato liquido o incapsulati sono riportati nella Tabella 13.

Questi dati evidenziano una riduzione significativa della vitalità spermatica del gruppo "capsule" rispetto al "controllo". L'incapsulazione del materiale seminale

provoca un'iniziale riduzione dei valori di integrità di membrana di circa il 20% (tempo 0) ed il successivo raggiungimento di un *plateau* dei livelli di vitalità a 24h. Per il gruppo “sortato capsule” è possibile osservare lo stesso andamento del gruppo “capsule”, ovvero, al tempo 0 valori di vitalità inferiori rispetto al gruppo “sortato diluito” ed una successiva stabilizzazione della percentuale di spermatozoi vitali (Fig. 9). In termini di vitalità percentuale non esiste una differenza significativa tra i gruppi “sortato diluito” e “sortato capsule”.

Tabella 13. Sono riportati i valori della vitalità percentuale media, estrapolata da tutta la curva (Vitalità %) e a sole 72h (Vitalità % 72h), di ciascun gruppo di trattamento con i corrispondenti valori di deviazione standard (Dev. St.).

Gruppi di trattamento	Vitalità%	Dev. St.	Vitalità% 72h	Dev. St.
Controllo	82.35 ^a	7.70	75.59 ^a	8.88
Capsule	62.69 ^b	10.70	55.14 ^b	11.32
Sortato diluito	55.12 ^c	16.66	39.98 ^c	14.38
Sortato capsule	52.01 ^c	10.02	44.32 ^{bc}	11.72

A lettere diverse corrispondono differenze significative tra i gruppi ($p < 0.05$).

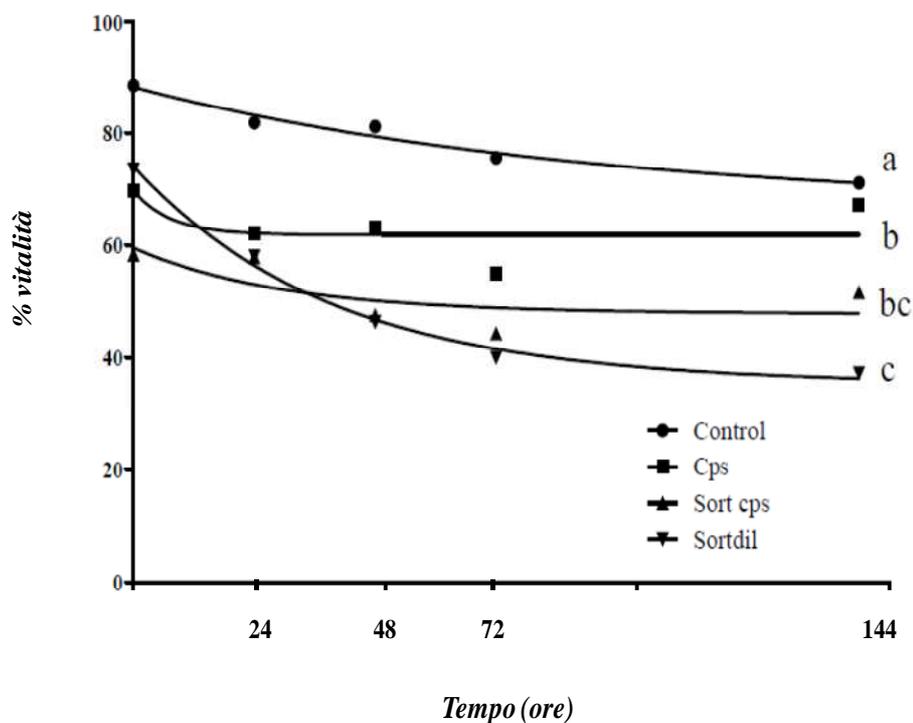


Fig. 10. Vitalità percentuale degli spermatozoi dei 4 gruppi di trattamento valutata a 0, 24, 48, 72 e 144 ore dal prelievo del materiale seminale.

A lettere diverse corrisponde una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$). Le lettere presenti nel grafico si riferiscono esclusivamente ai valori di vitalità a 72h.

3.1.2 Integrità acrosomiale

Nella Tabella 14 sono riportati i valori percentuali medi di integrità acrosomiale dei quattro gruppi di trattamento. Le cellule spermatiche di controllo sottoposte ad

incapsulazione hanno mostrato una diminuzione significativa dell'integrità acrosomiale rispetto al seme di controllo diluito.

La procedura di sortaggio ha provocato un calo significativo della percentuale di cellule che presentano l'acrosoma integro sia nei campioni diluiti che nei campioni incapsulati in confronto sia al seme di controllo liquido che incapsulato. La percentuale di spermatozoi aventi membrana acrosomiale integra è superiore nel gruppo "sortato diluito" rispetto al gruppo "sortato capsule"; il Test di Tukey non ha però evidenziato differenze significative tra questi due gruppi. Dopo 72 ore di conservazione a 15°C, gli spermatozoi sortati conservati sia allo stato liquido che mediante incapsulazione hanno mostrato una diminuzione significativa del numero di cellule con acrosoma integro rispetto al seme di controllo diluito ma non rispetto a quello incapsulato (Fig. 10).

Tabella 14. Sono riportati i valori di integrità acrosomiale percentuale media, estrapolata da tutta la curva (Integr. Acros.%) e a 72h (Integr. Acros. % 72h), di ciascun gruppo di trattamento con i corrispondenti valori di Deviazione Standard (Dev. St.).

Gruppi di trattamento	% Integr. Acros.	Dev. St.	% Integr. Acros. 72h	Dev. St.
Controllo	96.78 ^a	2.21	96.73 ^a	2.22
Capsule	88.10 ^b	9.52	82.19 ^{ab}	13.93
Sortato diluito	80.03 ^c	12.83	74.32 ^b	12.17
Sortato capsule	74.25 ^c	11.88	66.07 ^b	10.83

A lettere diverse corrispondono differenze significative tra i gruppi (P<0.05).

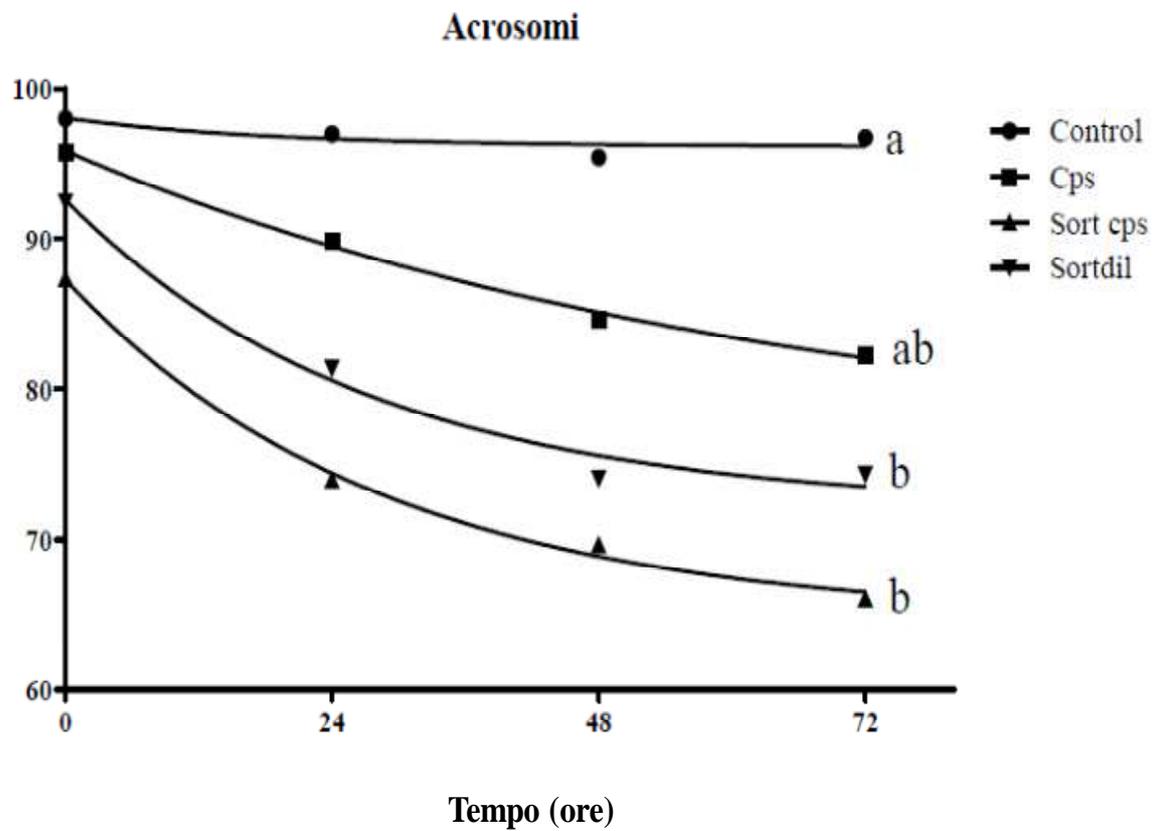


Fig. 11. Integrità acrosomiale percentuale degli spermatozoi dei 4 gruppi valutata a 0, 24, 48 e 72 ore dal prelievo del materiale seminale. Il grafico riporta sull'asse delle ascisse il tempo (ore) e sull'asse delle ordinate la % di spermatozoi con membrana acrosomiale integra.

A lettere diverse corrisponde una differenza statisticamente significativa ($P < 0.05$). Le lettere presenti nel grafico si riferiscono esclusivamente ai valori di integrità acrosomiale a 72h.

3.2 Valutazione della capacità fecondante del seme sortato di suino conservato allo stato liquido o incapsulato.

Mediante l'analisi di regressione logistica è stato valutato l'effetto del trattamento, del verro e del tempo sulle potenzialità fecondanti *in vitro* del materiale seminale sessato diluito e incapsulato. L'analisi statistica ha evidenziato un'influenza significativa ($p < 0.0001$) delle tre variabili indipendenti e categoriche: trattamento, verro, tempo. Le variabili risposta, o variabili dipendenti, considerate nell'analisi di regressione logistica sono: la percentuale di penetrazione (oociti penetrati/numero totale inseminati), l'efficienza totale della fecondazione (oociti normospermici/totale inseminati) e il tasso di normospermia (oociti normospermici/oociti penetrati)(Tab.15). Nella Tabella sono riportati i valori di OR medio e rispettivo intervallo di confidenza al 95% delle tre variabili indipendenti considerando come variabile di risposta il rapporto oociti penetrati/oociti totali. Tutti le associazioni risultano avere significatività statistica.

Tabella 15. Analisi di regressione logistica. Variabile risposta: Oociti penetrati/Oociti totali. Odds Ratio medio (OR), Intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) e significatività statistica (p value).

Variabile indipendente		OR	IC 95%	p value
Trattamento	Sort CPS/Sort Dil	0.271	0.198 – 0.370	$p < 0.0001$
Verro	Verro1/Verro2	0.127	0.092 – 0.174	$p < 0.0001$
Tempo	24/72h	10.656	5.498 – 20.653	$p < 0.0001$
	48/72h	9.933	5.210 – 18.940	$p < 0.0001$

I risultati riportati nella Tabella 15 confermano i precedenti dati. Infatti i valori di $OR < 1$ delle variabili trattamento e verro, confermano le migliori capacità di penetrazione degli spermatozoi non incapsulati e prelevati dal verro 2. Gli OR medi riferiti alla variabile tempo invece hanno valori superiori a 1, a conferma del fatto che

il rapporto n°oociti penetrati/n°oociti totali è ampiamente maggiore ai tempi 24 e 48h rispetto al tempo 72h.

Nella Tabella 16 sono riportati i valori di OR medio e rispettivo intervallo di confidenza al 95% delle tre variabili indipendenti considerando come variabile di risposta il rapporto oociti normospermici/oociti inseminati totali (efficienza totale della fecondazione). Solo l'associazione Verro1/Verro2 risulta avere significatività statistica.

Tabella 16. Analisi di regressione logistica. Variabile risposta: Oociti normospermici/Oociti totali. Odds Ratio medio (OR), Intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) e significatività statistica (p value).

Variabile indipendente		OR	IC 95%	p value
Trattamento	Sort CPS/Sort Dil	0.817	0.586 – 1.139	p=0.232
Verro	Verro1/Verro2	0.399	0.283 – 0.561	p<0.0001
Tempo	24/72h	2.517	1.276 – 4.964	p=0.057
	48/72h	2.762	1.427 – 5.346	p=0.0074

Nella Tabella 17 sono riportati i valori di OR medio e rispettivo intervallo di confidenza al 95% delle tre variabili indipendenti considerando come variabile di risposta il rapporto oociti normospermici/oociti penetrati (tasso di normospermia). Gli OR medi riferiti alla variabile indipendente tempo non sono statisticamente significativi.

I risultati illustrati fino ad ora indicano un minor “rischio” di fecondazione *in vitro* utilizzando materiale seminale sessato incapsulato; nonostante questo, il rapporto oociti normospermici/oociti penetrati (tasso di normospermia) è significativamente superiore nel gruppo “sortato capsule” rispetto al gruppo “sortato diluito”.

Tabella 17. Analisi di regressione logistica. Variabile risposta: Oociti normospermici/Oociti fecondati. Odds Ratio medio (OR), Intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) e significatività statistica (p value).

Variabile indipendente		OR	IC 95%	p value
Trattamento	Sort CPS/Sort Dil	3.429	2.130 – 5.519	p<0.0001
Verro	Verro1/Verro2	3.284	1.950 – 5.529	p<0.0001
Tempo	24/72h	0.105	0.021 – 0.511	p<0.0081
	48/72h	0.112	0.023 – 0.541	p=0.0139

E' quindi possibile asserire che il rischio di polispermia è significativamente minore per gli spermatozoi incapsulati rispetto a quelli diluiti, indipendentemente dal tempo di conservazione.

Nella Figura 11 è rappresentato l'andamento temporale della percentuale di oociti fecondati *in vitro* con materiale seminale sessato diluito ed incapsulato. Al tempo 24h la percentuale di oociti fecondati con spermatozoi del gruppo "sortato capsule" è, rispetto al gruppo "sortato diluito", inferiore del 35%. Durante il periodo di conservazione però il divario tra i due gruppi si riduce fortemente; infatti dopo 72h la percentuale di oociti fecondati con spermatozoi dei due gruppi è paragonabile.

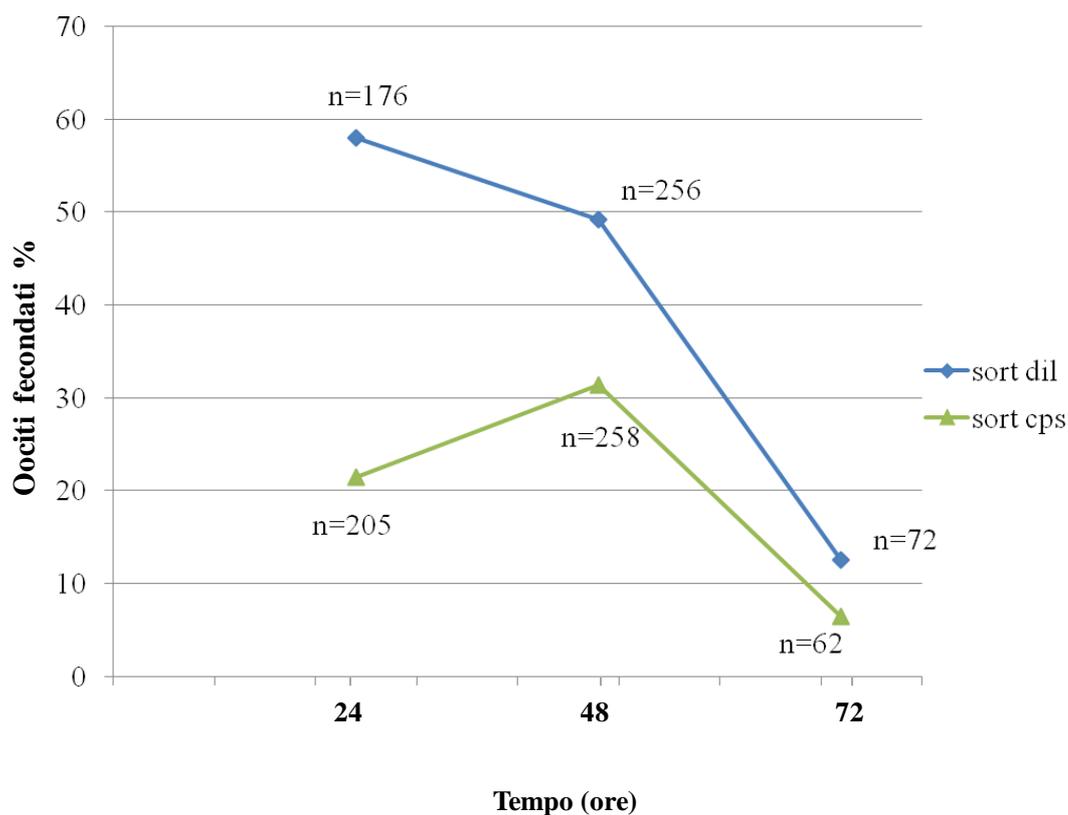


Fig. 12. Percentuale di oociti fecondati dopo test di fecondazione *in vitro* con spermatozoi del gruppo “sortato diluito” e “sortato capsule”. Il valore n indica il numero totale di oociti sottoposti al test di fecondazione *in vitro*.

Nella Figura 12 viene confrontata l’efficienza totale dell’inseminazione dopo test di fecondazione *in vitro* con spermatozoi del gruppo “sortato capsule” e “sortato diluito”. Nonostante le differenze esistenti tra i gruppi “sortato capsule” e “sortato diluito” in termini di capacità di penetrazione e potenzialità fecondanti *in vitro*, i due gruppi non presentano differenze dal punto di vista dell’efficienza totale dell’inseminazione.

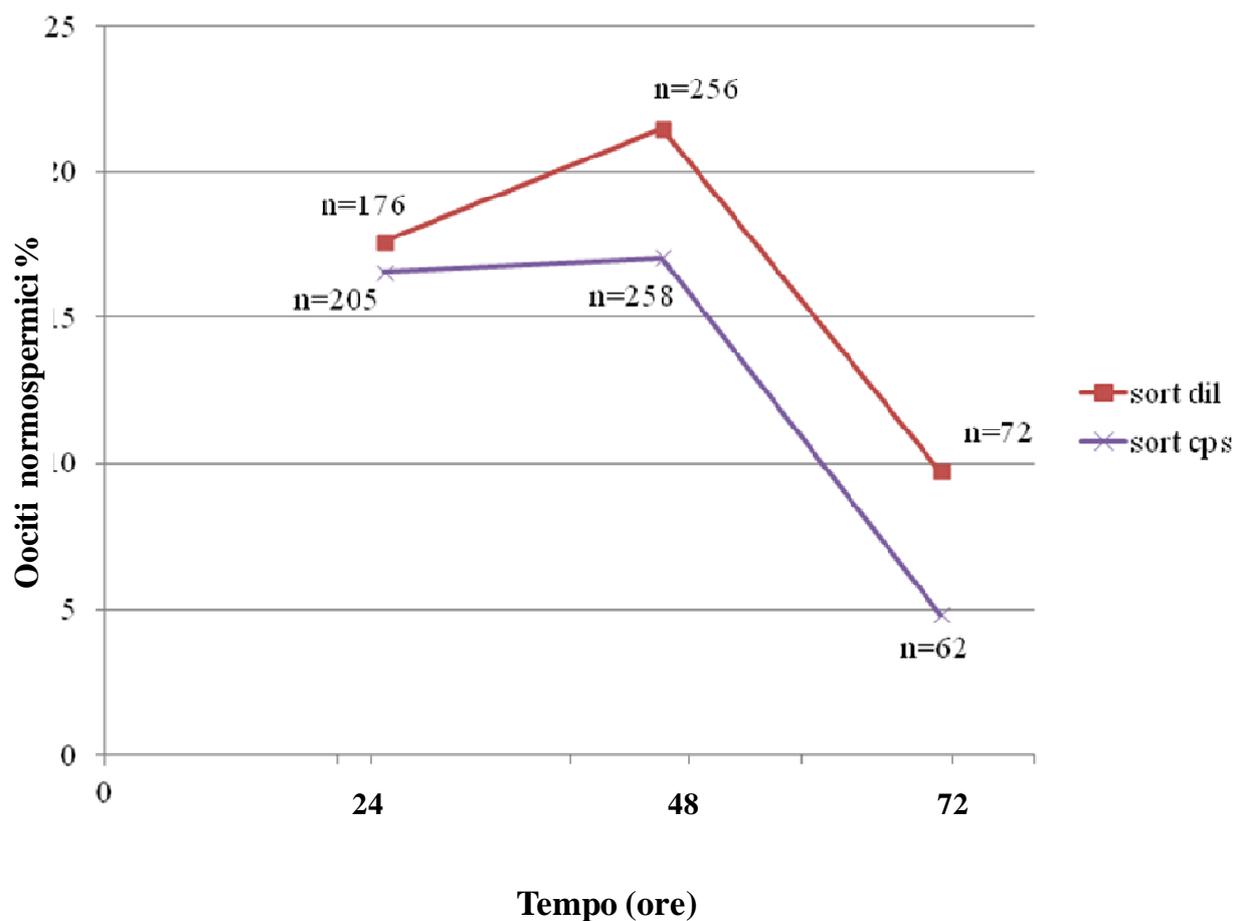


Fig. 13. Il grafico riporta sull'asse delle ascisse le ore e sull'asse delle ordinate la % di oociti normospermici sul totale degli oociti inseminati (efficienza totale inseminazione) dopo test di fecondazione *in vitro* con spermatozoi del gruppo “sortato diluito” e “sortato capsule”. Il valore n indica il numero totale di oociti sottoposti al test di fecondazione *in vitro*.

DISCUSSIONE ESPERIMENTO 3

Nell'ultimo decennio la comunità scientifica ha rivolto sempre maggiore attenzione allo sviluppo di nuove tecnologie riproduttive nelle specie di interesse zootecnico. La specie suina è però caratterizzata da gameti maschili sensibili all'ossidazione, alla diluizione ed allo shock termico in grado di provocare danni che si acquiscono durante la conservazione del materiale seminale; per tutti questi motivi le ricerche sono state indirizzate all'ottimizzazione delle procedure di conservazione nel tentativo di minimizzare il peggioramento delle caratteristiche morfo-fisiologiche delle cellule spermatiche.

L'incapsulazione del materiale seminale ha trovato ampio sviluppo in ambito biotecnologico in quanto risulta migliorare le performance riproduttive di molte specie di mammiferi. Vigo e collaboratori (2009) hanno condotto uno studio su larga scala per confrontare l'efficacia dell'impiego della tradizionale procedura di inseminazione artificiale assunta come trattamento di controllo, con quella ottenuta mediante l'utilizzo di capsule contenenti gli spermatozoi di verro. I dati ottenuti da questi Autori hanno dimostrato che, in termini di diagnosi di gravidanza e parti avvenuti con successo, non esiste differenza statisticamente significativa tra seme incapsulato ed inseminazioni tradizionali. La quantità di spermatozoi impiegata per l'inseminazione strumentale mediante capsule (2.90 ± 0.91 miliardi di cellule) è, invece, significativamente minore ($p < 0.0001$) rispetto a quella utilizzata nel gruppo di controllo (4.91 ± 0.54 miliardi di spermatozoi).

D'altra parte Faustini et al. (2010) hanno mostrato come impiegando gli spermatozoi di verro incapsulati nella fecondazione *in vitro* sia stata ottenuta una diminuzione del tasso di polispermia rispetto all'utilizzo del seme diluito.

I buoni risultati ottenuti con questi studi di fecondazione *in vivo* ed *in vitro* hanno fatto emergere la possibilità di utilizzare la tecnologia di incapsulazione per conservare il seme di suino dopo il *sex-sorting*. La procedura di sortaggio, come abbiamo già detto, presenta purtroppo una serie di limitazioni al suo utilizzo a causa

della lentezza del processo, del basso numero di spermatozoi ottenuti e della minore capacità fecondante delle cellule spermatiche provocata dal veloce calo della qualità del materiale seminale sortato.

L'impiego delle capsule, poiché è un sistema che permette il rilascio graduale e prolungato degli spermatozoi, potrebbe migliorare l'efficienza riproduttiva del seme sortato, ed inoltre potrebbe ovviare al problema dato dalla disponibilità di un numero molto basso di spermatozoi sortati.

In questo studio sono stati messi a confronto i parametri qualitativi e la capacità fecondante degli spermatozoi di suino sortati e conservati per 24, 48 e 72 ore.

In termini di vitalità percentuale ed integrità acrosomiale percentuale, è stato dimostrato che non esistono differenze significative tra il materiale seminale suino sortato diluito e quello sottoposto ad incapsulazione post-sorting, dimostrando in questa maniera che il materiale seminale sortato non viene danneggiato dal processo di incapsulazione. Questi risultati confermano i dati ottenuti da Vigo et al. (2002a) i quali avevano osservato come gli spermatozoi sottoposti ad incapsulazione non avessero mostrato cambiamenti significativi delle loro caratteristiche morfologiche e funzionali rispetto alle cellule spermatiche di suino diluite.

Per quanto riguarda la capacità fecondante del seme, mentre gli oociti fecondati *in vitro* con spermatozoi sortati incapsulati hanno mostrato una percentuale di penetrazione inferiore rispetto a quelli fecondati con seme sortato diluito, l'efficienza totale dell'inseminazione non ha mostrato differenze significative nei due gruppi analizzati. Il tasso di normospermia è risultato addirittura aumentato in seguito all'utilizzo di seme sortato incapsulato rispetto al seme sortato diluito, confermando i dati ottenuti da Faustini et al. (2010) in seguito a IVF con seme di suino incapsulato. Analizzando i risultati ottenuti, si può concludere dicendo che l'incapsulazione del seme sortato non sembra provocare alterazioni significative delle caratteristiche qualitative delle cellule spermatiche e che, nonostante la percentuale di penetrazione degli oociti subisca un calo significativo in seguito all'utilizzo degli spermatozoi

incapsulati post *sorting*, l'efficienza totale della fecondazione sembra non essere influenzata negativamente dalla procedura di incapsulazione.

A questo punto, dopo aver verificato che l'incapsulazione non determina un ulteriore peggioramento delle caratteristiche qualitative e della capacità fecondante degli spermatozoi sortati, è necessario testare l'efficacia della metodica *in vivo* dove il rilascio graduale delle cellule spermatiche contenute nelle capsule di alginato di bario potrebbe incrementare le rese solitamente ottenute mediante l'utilizzo di seme sortato diluito.

CONCLUSIONI

La separazione degli spermatozoi in base al differente contenuto di DNA dei cromosomi X e Y mediante citofluorimetria a flusso è, al momento, l'unico metodo efficace per predeterminare il sesso della prole prima della fertilizzazione. Sebbene questa tecnica abbia raggiunto una diffusione commerciale nella specie bovina, nel suino un uso routinario del seme sortato è molto lontano dall'essere una realtà.

Come abbiamo già ampiamente detto molti sono i problemi da risolvere allo scopo di applicare questa tecnologia nella specie suina. Innanzitutto il primo fattore limitante è la difficoltà di ottenere un numero di spermatozoi sortati adeguato per eseguire un'inseminazione artificiale convenzionale. Inoltre, un altro fattore che contribuisce a ostacolare l'utilizzo di questa tecnologia è la suscettibilità degli spermatozoi di suino agli stress indotti dal *sex-sorting*. Infatti durante la procedura di sortaggio gli spermatozoi vengono sottoposti ad insulti fisici, chimici ed elettrici che sembrano indurre cambiamenti simil-capacitativi (Maxwell e Johnson, 1997) che riducono la sopravvivenza e la capacità fecondante degli spermatozoi sortati (Parilla et al., 2005). Questa tesi è stata suddivisa in tre esperimenti che sono serviti prima di tutto a identificare i danni indotti sia dalla procedura di sortaggio che dalla successiva conservazione e si è tentato di minimizzare l'azione deleteria di tutti questi processi mediante l'aggiunta di sostanze antiossidanti e l'utilizzo di una nuova metodica per la conservazione degli spermatozoi sortati di suino.

Nel primo esperimento sono stati identificati i danni causati dall'azione sinergica della procedura di sortaggio e della conservazione allo stato liquido a 15°C per 24-26 ore utilizzando come parametri la vitalità, l'esocitosi acrosomiale, la presenza e la localizzazione dell'Hsp70 e valutando la capacità fecondante del seme subito dopo il *sex-sorting* e la conseguente conservazione per 24-26h .

La riduzione della percentuale di cellule vive da noi rilevata dopo la conservazione allo stato liquido per 24-26 ore è risultata più evidente per gli spermatozoi sortati rispetto a quelli di controllo, confermando come la procedura di sortaggio sembri accrescere la sensibilità del gamete maschile alla conservazione.

La procedura di sortaggio è in grado di provocare la rilocalizzazione dell'Hsp70 verso i pattern tipici degli spermatozoi capacitati, ma con il Western blotting non è stato evidenziato alcun consumo di questa proteina in seguito all'intera procedura. Tuttavia i campioni sortati e conservati per 24-26 ore hanno mostrato un aumento del numero delle cellule negative all'Hsp70, come è stato osservato mediante l'immunofluorescenza, e un calo del contenuto di questa proteina, come è stato evidenziato con il Western blotting. Una ipotesi per giustificare questi risultati potrebbe essere il consumo di questa chaperonina da parte degli spermatozoi nel tentativo di mantenere la giusta conformazione proteica in seguito all'associazione degli stress provocati dalla procedura di sortaggio e dalla conservazione allo stato liquido.

Dai risultati da noi ottenuti in seguito a fecondazione *in vitro*, il seme sortato, dopo un periodo di conservazione di 24-26 ore, ha mantenuto un certo grado di capacità fecondante che è risultata significativamente inferiore a quella ottenuta utilizzando seme appena sortato. Essendo stata dimostrata da vari autori una correlazione positiva tra i livelli di Hsp70 e la capacità fecondante del seme (Spinaci et al., 2005) si può ipotizzare che la riduzione dei livelli di Hsp70 e l'aumento del numero di cellule negative, osservati negli spermatozoi conservati per 24-26 ore post-sorting, possano contribuire, almeno in parte, al progressivo calo della capacità fecondante degli spermatozoi sessati.

Una volta identificate le modificazioni a carico degli spermatozoi, lo scopo del secondo esperimento è stato quello di identificare e quindi testare delle sostanze la cui attività fosse in grado di minimizzare l'azione dannosa del *sex-sorting* e della conservazione sulle cellule spermatiche, avendo vari autori già identificato i ROS

(reactive oxygen species: specie reattive dell'ossigeno) come i principali responsabili del deterioramento della funzionalità spermatica (Johnson et al., 2000b).

Lo stress provocato dalla fase di colorazione e dal seguente processo di sortaggio ha ridotto la vitalità degli spermatozoi, ha aumentato il numero di cellule morte con caspasi attivate, mentre non ha modificato in maniera significativa la percentuale dell'integrità acrosomiale. L'azione degli antiossidanti non si è rivelata efficace nel miglioramento della qualità degli spermatozoi durante le fasi di colorazione e passaggio attraverso il citofluorimetro. D'altra parte durante la conservazione per 24 ore l'azione congiunta del plasma seminale e degli antiossidanti superossido dismutasi (SOD) o epigallocatechin-3-gallato (EGCG) hanno indotto un miglioramento significativo della vitalità degli spermatozoi rispetto a quelli sortati e conservati senza alcun supplemento, mentre non hanno esercitato alcun effetto benefico sugli altri parametri valutati (integrità acrosomiale, localizzazione Hsp70, attivazione delle caspasi). L'EGCG sembra inoltre in grado di esercitare un'azione di inibizione sulle caspasi attivate. Questi dati sono in accordo con lo studio eseguito da Katunuma et al. (2006) i quali hanno evidenziato il ruolo dell'EGCG come inibitore specifico delle caspasi 3, 7 e 2 durante l'induzione sperimentale del processo apoptotico. Per la conservazione del seme di suino oltre alla conservazione allo stato liquido e al congelamento Torre e collaboratori (2002) hanno messo a punto l'incapsulazione degli spermatozoi in membrane di alginato di bario. Per tale ragione nel terzo esperimento abbiamo messo in comparazione la vitalità, l'integrità acrosomiale e la capacità fecondante degli spermatozoi di suino sortati e conservati mediante incapsulazione con i campioni di seme sortato conservato allo stato liquido. I risultati hanno dimostrato che il materiale seminale sortato non è stato danneggiato dall'incapsulazione, infatti non esistono differenze significative tra il seme sortato e diluito e il sortato incapsulato in termini di vitalità e di integrità acrosomiale. D'altra parte è stata registrata una diminuzione della percentuale di penetrazione degli oociti fecondati con seme sortato incapsulato rispetto al seme sortato diluito, mentre non sono state evidenziate differenze significative nell'efficienza totale

dell'inseminazione e il tasso di normospermia raggiunto con il seme sortato incapsulato è addirittura aumentato. Poiché l'impiego del processo di incapsulazione non sembra provocare un peggioramento delle caratteristiche morfo-funzionali degli spermatozoi sortati e conservati, l'utilizzo delle capsule, essendo un sistema che permette il rilascio graduale e prolungato degli spermatozoi, potrebbe migliorare l'efficienza riproduttiva del seme sortato, ed inoltre potrebbe ovviare al problema dato dalla disponibilità di un numero molto basso di spermatozoi sortati.

Analizzando tutti i risultati ottenuti nei tre esperimenti di questa tesi, si può concludere dicendo che gli spermatozoi sottoposti alla procedura di sortaggio e alla conservazione a 15°C subiscono un calo delle caratteristiche morfo-funzionali e che l'aggiunta di sostanze antiossidanti è in grado di migliorare solo parzialmente le caratteristiche qualitative del seme sortato durante la conservazione allo stato liquido. La conservazione degli spermatozoi di suino mediante la metodica di incapsulazione, non induce alcun miglioramento della qualità del seme ma d'altra parte non provoca un ulteriore deterioramento dei parametri qualitativi analizzati; per questo motivo questa tecnica può essere sfruttata poichè presuppone un rilascio graduale degli spermatozoi nel tratto genitale femminile e l'utilizzo di un quantitativo limitato di cellule spermatiche. Ad ogni modo per valutare l'efficacia reale dell'azione degli antiossidanti e dell'incapsulazione nell'ottimizzare la conservazione del seme sortato di suino sono necessarie prove di fecondazione *in vivo*, le quali possono darci indicazioni utili per comprendere i miglioramenti apportati dall'applicazione di queste tecniche. Nonostante gli sforzi effettuati negli ultimi anni dai ricercatori, sono necessari ulteriori studi per ottimizzare la procedura di sortaggio, la conservazione e l'inseminazione ed arrivare all'utilizzo su vasta scala del seme sortato suino.

BIBLIOGRAFIA

Adeoya-Osiguwa SA, Fraser LR, 1993. A biphasic pattern of $^{45}\text{Ca}^{2+}$ uptake by mouse spermatozoa in vitro correlates with changing functional potential. *J Reprod Fertil. Sep;99(1)*, 187-94.

Althouse GC, Wilson ME, Kuster C, Parsley M, 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology. 1998 Sep;50(4)*, 535-43.

Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. *Biol. Reprod. 29*, 548–555.

Alvarez, J.G., Touchtone, J.C., Blasco, L., Storey, B.T., 1987. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl. 8*, 338–348.

Alvarez, J.G., Storey, B.T., 1989. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. *Gamete Res. 23*, 77–90.

Aziz N, Said T, Paasch U, Agarwal A, 2007. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. *Hum Reprod. May;22(5)*, 1413-9.

Bailey JL, Lessard C, Jacques J, Breque C, Dobrinski I, Zeng WX & Galantino-Homer HL, 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology* 70, 1251–1259.

Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA, 2003. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl.* 2003 Jul-Aug;24(4), 621-8.

Barlow P and Vosa CG (1970) The Y chromosome in human spermatozoa *Nature, London* 226 961-962.

Bathgate R, 2008. Functional integrity of sex-sorted, frozen-thawed boar sperm and its potential for artificial insemination. *Theriogenology.* Nov;70(8):1234-41.

Bathgate R, Grossfeld R, Susetio D, Ruckholdt M, Heasman K, Rath D, Evans G, Maxwell WM, 2008. Early pregnancy loss in sows after low dose, deep uterine artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed sperm. *Anim Reprod Sci.* Mar 3;104(2-4), 440-4.

Bennetts, L.E., Aitken, R.J., 2005. A comparative study of oxidative DNA damage in mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 77–87.

Bianchi I, Calderam K, Maschio EF, Madeira EM, da Rosa Ulguim R, Corcini CD, Bongalhardo DC, Corrêa EK, Lucia T Jr, Deschamps JC, Corrêa MN, 2008. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. *Theriogenology.* Mar 15;69(5), 632-8.

Boe-Hansen GB, Christensen P, Vibjerg D, Nielsen MB, Hedeboe AM, 2008. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology.* Apr 1;69(6), 728-36.

- Bohring C, Krause W, 2003. Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *Am J Reprod Immunol*. Nov;50(5), 411-9.
- Brackett BG, Oliphant G, 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*;12, 260 –74.
- Bravo MM, Aparicio IM, Garcia-Herreros M, Gil MC, Peña FJ, Garcia-Marin LJ, 2005. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. May;71(1), 88-96.
- Brener E, Rubinstein S, Cohen G, Shternall K, Rivlin J, Breitbart H, 2003. Remodeling of the actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. Mar;68(3), 837-45.
- Breininger E, Beorlegui NB, O'Flaherty CM, Beconi MT, 2005. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology*. May;63(8), 2126-35.
- Brüssow KP, Torner H, Rátky J, Manabe N, Tuchscherer A, 2006. Experimental evidence for the influence of cumulus-oocyte-complexes on sperm release from the porcine oviductal sperm reservoir. *J Reprod Dev* Apr;52(2), 249-57.
- Bucci D, Galeati G, Tamanini C, Vallorani C, Rodriguez-Gil JE, Spinaci M, 2011. Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa. *Theriogenology*. Dec 20, in press.
- Buhr MM, Curtis EF, Kakuda NS, 1994. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. Jun;31(3), 224-38.
- Bwanga CO, Ekwall H, e Rodriguez-Martinez H, 1991. Cryopreservation of boar semen III: ultrastructure of boar spermatozoa frozen ultra- rapidly at various stages

of conventional freezing and thawing. *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 32, no. 4, pp. 463-471.

Caballero I, Vázquez JM, García EM, Roca J, Martínez EA, Calvete JJ, Sanz L, Ekwall H, Rodríguez-Martínez H, 2006. Immunolocalization and possible functional role of PSP-I/PSP-II heterodimer in highly extended boar spermatozoa. *J Androl.* Nov-Dec;27(6), 766-73.

Caballero I, Vazquez JM, García EM, Parrilla I, Roca J, Calvete JJ, Sanz L, Martínez EA, 2008. Major proteins of boar seminal plasma as a tool for biotechnological preservation of spermatozoa. *Theriogenology.* Nov;70(8), 1352-5.

Caballero I, Vazquez JM, Mayor GM, Almiñana C, Calvete JJ, Sanz L, Roca J, Martínez EA, 2009. PSP-I/PSP-II spermadhesin exert a decapacitation effect on highly extended boar spermatozoa. *Int J Androl.* Oct;32(5),505-13

Carvajal G, Cuello C, Ruiz M, Vázquez JM, Martínez EA, Roca J, 2004. Effects of centrifugation before freezing on boar sperm cryosurvival. *J Androl.* 2004 May-Jun;25(3), 389-96

Centurion F, Vazquez JM, Calvete JJ, Roca J, Sanz L, Parrilla I, Garcia EM, Martínez EA, 2003. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. *Biol Reprod.* Aug;69(2), 640-6.

Cerolini S, Maldjian A, Surai P, Noble R, 2000. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. *Anim Reprod Sci.* Feb 28;58(1-2), 99-111.

Cerolini S, Maldjian A, Pizzi F, Gliozzi TM, 2001. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. *Reproduction.* Mar;121(3), 395-401.

Chakrabarty J, Banerjee D, Pal D, De J, Ghosh A, Majumder GC, 2007. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*. Feb;54(1), 27-35.

Chang TMS (1957). Hemoglobin corpuscles. Research Report for Honours Physiology, Medical Library, McGill University. Also reprinted as part of 30th anniversary in Artificial Red Blood Cells Research. *Biomaterials, Artificial Cells, and Artificial Organs* 16, 1-9.

Chang TMS (1998). Pharmaceutical and therapeutic applications of artificial cells including microencapsulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 45, 3-8.

Chatterjee S, Gagnon C, 2001. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*. Aug;59(4), 451-8.

Chou KCK, Wang HY, 2003. Method of artificial insemination by timed release of sperm from capsules or solid beads. US Patent n°: US20036596310.

Christensen P, Knudsen DB, Wachmann H, Madsen MT, 2004. Quality control in boar semen production by use of the FACSCount AF system. *Theriogenology*. Oct 1;62(7), 1218-28.

Conejo-Nava J, Fierro R, Gutierrez CG, Betancourt M, 2003. Membrane status and in vitro capacitation of porcine sperm preserved in long-term extender at 16 degrees C. *Arch Androl*. Jul-Aug;49(4), 287-95.

Crabo BG, Brown KI, Graham EF, 1972. Effect of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. *J Anim Sci*. Aug;35(2), 377-82.

Cross, N.L., Morales, P., Overstreet, J.W., Hanson, F.W. (1986) Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 15, 213-226.

Cross, N.L., Watson, S.K. (1994) Assessing acrosomal status of bovine sperm using fluorescinated lectins. *Theriogenology* 42, 89-98.

De Ambrogi M, Ballester J, Saravia F, Caballero I, Johannisson A, Wallgren M, Andersson M, Rodriguez-Martinez H, 2006a. Effect of storage in short--and long-term commercial semen extenders on the motility, plasma membrane and chromatin integrity of boar spermatozoa. *Int J Androl.* Oct;29(5), 543-52.

De Ambrogi M, Spinaci M, Galeati G, Tamanini C, 2006b. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* Nov;66(8), 1994-2000.

de Graff, S.P., Evans, G., Gillan, L., Guerra, M.M.P., Maxwell, W.M.C., O'Brien, J.K., 2007. The influence of antioxidants, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. *Theriogenology* 67, 217–227.

De Lamirande E, Gagnon C, 1992. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl.* Sep-Oct;13(5), 379-86

De Leeuw, F.E., Colenbrander, B., Verkleij, A.J., 1990. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. *Reprod. Domest. Anim. Suppl.* 1., 95–104.

DiBerardino D, Gil MA, Parrilla I, Fernandez MA, Coppola G, Mazza MR, et al, 2000. Pronuclear formation and embryo development in pig oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*; 53, 389 [abstr.].

Drobnis EZ, Crowe LM, Berger T, Anchordoguy TJ, Overstreet JW, Crowe JH, 1993. Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. *J Exp Zool.* 1993 Mar 15;265(4), 432-7

Dubé C, Beaulieu M, Reyes-Moreno C, Guillemette C, Bailey JL, 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology*. Sep 1;62(5), 874-86.

Eriksson BM, Petersson H, Rodriguez-Martinez H, 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology*. Oct 1;58(6), 1065-79.

Fantinati P, Zannoni A, Bernardini C, Webster N, Lavitrano M, Forni M, Seren E, Bacci ML, 2005. Laparoscopic insemination technique with low numbers of spermatozoa in superovulated prepuberal gilts for biotechnological application. *Theriogenology*. Feb;63(3), 806-17.

Faustini M, Torre ML, Stacchezzini S, Norberi R, Consiglio AL, Porcelli F, Conte U, Munari E, Russo V, Vigo D, 2004. Boar spermatozoa encapsulated in barium alginate membranes: a microdensitometric evaluation of some enzymatic activities during storage at 18°C. *Theriogenology* 61, 173-184.

Faustini M, Riccardi A, Villani S, Russo V, Torre ML, Conte U, Vigo D, 2008. A single insemination intervention in the sow with barium alginate-encapsulated boar semen. *Veterinary Research Communications* 32, 147–149.

Faustini M, Bucco M, Galeati G, Spinaci M, Villani S, Chlapanidas T, Ghidoni I, Vigo D, Torre ML, 2010. Boar sperm encapsulation reduces in vitro polyspermy. *Reproduction in Domestic Animals* 45, 359–362.

Fazeli A, Hage WJ, Cheng FP, Voorhout WF, Marks A, Bevers MM, Colenbrander B, 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol Reprod*;56(2), 430–8.

Foote RH, 2002. The history of artificial insemination: selected notes and notables. *Simposia supplement of Journal Animal Science*. ASAS 2001 Joint National Meeting (Vol 80 E- Suppl. 2) Orlando, FL, USA.

Fraser L, Lecewicz M, Strzezek J, 2002. Fluorometric assessments of viability and mitochondrial status of boar spermatozoa following liquid storage. *Pol J Vet Sci.*;5(2), 85-92.

Fraser L, Strzezek J, 2004. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol.*;42(1), 49-55.

Fuller BJ, 2004. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo Letters*. Nov-Dec;25(6), 375-88. Review.

Funahashi H, Cantley T, Day BN, 1997. Synchronization of meiosis in porcine oocytes by exposure to dibutyryl cyclic adenosine monophosphate improves developmental competence following in vitro fertilization. *Biol Reprod*;57, 49 –53.

Funahashi H, Sano T, 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. *Theriogenology*. Apr 1;63(6), 1605-16.

Gaczarzewicz D, Piasecka M, Udała J, Błaszczuk B, Stankiewicz T, Laszczyńska M, 2010. Plasma membrane changes during the liquid storage of boar spermatozoa: a comparison of methods. *Acta Vet Hung*. Mar;58(1),105-16.

Gadella BM, Flesch FM, van Golde LM, Colenbrander B, 1999. Dynamics in the membrane organization of the mammalian sperm cell and functionality in fertilization. *Vet Q*. Oct;21(4), 142-6. Review.

Gadella BM, Harrison RA, 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent, but apoptosis-unrelated, exposure of aminophospholipids

at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biol Reprod.* Jul;67(1), 340-50.

García EM, Vázquez JM, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, Parrilla I, Gil MA, Roca J, Martínez EA, 2006. Dissecting the protective effect of the seminal plasma spermadhesin PSP-I/PSP-II on boar sperm functionality. *J Androl.* May-Jun;27(3), 434-43.

García EM, Vázquez JM, Parrilla I, Calvete JJ, Sanz L, Caballero I, Roca J, Vazquez JL, Martínez EA, 2007. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. *Theriogenology.* Sep 15;68(5),771-8.

Garner DL, 2001. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *J Androl*, 22(4), 519-526.

George M, Abraham TE, 2006. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release* 114, 1-14.

Gething MJ, Sambrook J, 1992. Protein folding in the cell. *Nature*; 355, 33– 45.

Gillan L, Evans G, Maxwell WM, 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology.* Jan 15;63(2),445-57. Review.

Ghidoni I, Chlapanidas T, Bucco M, Crovato F, Marazzi M, Vigo D, Torre ML, Faustini M, 2008. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. *Cytotechnology* 58(1), 49-56.

Grossfeld R, Klinc P, Sieg B, Rath D, 2005. Production of piglets with sexed semen employing a non-surgical insemination technique. *Theriogenology.* May;63(8), 2269-77.

Grossfeld,2007:http://www.google.it/url?sa=t&rct=j&q=grossfeld%202007%20experiments%20to%20improve%20sexsorted%20boar%20spermatozoa&source=web&cd=1&ved=0CCsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fdeposit.ddb.de%2Fcgibin%2Fdokserv%3Fidn%3D986836907%26dok_var%3Dd1%26dok_ext%3Dpdf%26filename%3D986836907.pdf&ei=0iNCT4HIN4TU-ga64ujMBQ&usg=AFQjCNHZGMI6d6oCNJxk4mFUUhq8JQTLEA&cad=rja

Guthrie HD, Johnson LA, Garrett WM, Welch GR, Dobrinsky JR, 2002. Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine. *Mol Reprod Dev.* Jan;61(1),87-92.

Guthrie HD, Welch GR, 2005. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology.* 2005 Jan 15;63(2), 396-410 Review.

Guthrie, H.D., Welch, G.R., 2006. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.* 84, 2089–2100.

Guthrie HD, Welch GR, Long JA, 2008. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. *Theriogenology.* Nov;70(8),1209-15.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed. Clarendon Press, Oxford.

Harrison, R.A.P., Dott, H.M., Foster, G.C., 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the dilution effect. *J. Exp. Zool.* 222, 81–88.

Harrison, R.A.P., 1996. Capacitation mechanisms, and the role of capacitation as seen in eutherian mammals. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 581–594.

Herrler A, Eisner S, Bach V, Weissenborn U, Beier HM, 2006. Cryopreservation of spermatozoa in alginic acid capsules. *Journal of Reproduction and Fertility* 85(1), 208-213.

Holt WV, Van Look KJ, 2004. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. *Reproduction*. 2004 May;127(5), 527-35.

Huang SY, Kuo YH, Lee YP, Tsou HL, Lin EC, Ju CC, Lee WC, 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim Reprod Sci*;63, 231– 40.

Huang SY, Pribenszky C, Kuo YH, Teng SH, Chen YH, Chung MT, Chiu YF, 2009. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*. May;112(1-2), 136-49.

Hu JH, Li QW, Jiang ZL, Li WY, 2008. Effects of different extenders on DNA integrity of boar spermatozoa following freezing-thawing. *Cryobiology*. Dec;57(3), 257-62.

Hunter RH, 2003. Advances in deep uterine insemination: a fruitful way forward to exploit new sperm technologies in cattle. *Anim Reprod Sci*. Dec 15;79(3-4), 157-70. Review.

Jang HY, Kim YH, Kim BW, Park IC, Cheong HT, Kim JT, Park CK, Kong HS, Lee HK, Yang BK, 2010. Ameliorative effects of melatonin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Reprod Domest Anim*. 2010 Dec;45(6), 943-50.

Jelezarsky, L., Vaisberg, Ch., Chaushev, T., Sapundjiev, E., 2007. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory sex glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar spermatozoa. *Theriogenology* 69, 139–145.

Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ, 2009. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*. Apr;58(2),181-9.

Jeulin, C., Soufir, J.C., Weber, P., Laval-Martim, D., Calvayrac, R., 1989. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Res.* 24, 185–196.

Johnson LA e Pinkel DA, 1986. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry*, 7, 268-273.

Johnson LA, 1991. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring following surgical insemination of flow sorted X- or Y- bearing sperm. *Reprod Dom Anim*, 26, 309-14.

Johnson LA, 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*, 60-61, 93-107.

Johnson, L.A., Guthrie, H.D., Fiser, P., Maxwell, W.M.C., Welch, G.R., Garrett, W.M., 2000a. Cryopreservation of flow cytometrically sorted boar sperm: effects on in vivo embryo development. *J. Anim. Sci.* 78 Suppl.1: 198. Abstract.

Johnson LA, Weitze KF, Fiser P, Maxwell WM, 2000b. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* Aug 18;62(1-3), 143-72.

Johnson LA, Rath D, Vasquez JM, Maxwell WMC, Dobrinsky JR, 2005. Preselection of sex of offspring in swine for production: current status of the process and its application. *Theriogenology* 63, 615-624.

Kalab P, Peknicová J, Geussová G, Moos J, 1998. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in boar sperm through a cAMP-dependent pathway. *Mol Reprod Dev.* Nov;51(3),304-14.

Karosas J, Rodriguez-Martinez H, 1993. Use of two detergents for freezing of boar semen in plastic bags. *Biomedical Research*, vol. 4 no. 2, pp. 125-136.

Katunuma, N., Ohashi, A., Sano, E., Ishimaru, N., Hayashi, Y., Murata, E., 2006. Catechin derivatives: specific inhibitor for caspases-3, 7 and 2, and the prevention of apoptosis at the cell and animal levels. *FEBS Lett.* 580 (3), 741–746.

Kikuchi K, Kashiwazaki N, Nagai T, Nakai M, Somfai T, Noguchi J, et al, 2008. Selected aspects of advanced porcine reproductive technology. *Reprod Dom Anim*;43(Suppl. 2), 401–6.

Klinc, P., Frese, D., Osmers, H., Rath, D., 2007. Insemination with sex sorted fresh bovine spermatozoa processed in the presence of antioxidative substances. *Reprod. Domest. Anim.* 42 (1), 58–62.

Klinc, P., Rath, D., 2007. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 63–67.

Kommisrud E, Paulenz H, Sehested E, Grevle IS, 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta Vet Scand.*;43(1), 49-55.

Kowalowka M, Wysocki P, Strzezek J, 2008. Extracellular superoxide dismutase of boar seminal plasma. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 490–496.

Krueger C, Rath D, Johnson LA, 1999. Low dose insemination in synchronized gilts. *Theriogenology* Dec;52(8),1363-73.

Kumaresan A, Kadirvel G, Bujarbaruah KM, Bardoloi RK, Das A, Kumar S, Naskar S, 2009. Preservation of boar semen at 18 degrees C induces lipid peroxidation and apoptosis like changes in spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* Jan;110(1-2), 162-71.

Kumaresan A, Siqueira AP, Hossain MS, Bergqvist AS, 2011. Cryopreservation-induced alterations in protein tyrosine phosphorylation of spermatozoa from different portions of the boar ejaculate. *Cryobiology*. Dec;63(3), 137-44.

Kuster CE, Althouse GC, 1999. The fecundity of porcine semen stored for 2 to 6 days in Androhep and X-CELL extenders. *Theriogenology*. Aug;52(3), 365-76.

Leahy T, Celi P, Bathgate R, Evans G, Maxwell WM, Marti JI, 2010. Flow-sorted ram spermatozoa are highly susceptible to hydrogen peroxide damage but are protected by seminal plasma and catalase. *Reprod Fertil Dev.*;22(7),1131-40.

Leahy T, Gadella BM, 2011. Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction* Dec;142(6),759-78.

Lim F e Sun AM, 1980. Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science* 210, 908-910.

Malo C, Gil L, Cano R, Martínez F, Galé I, 2011. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*. Jun;75(9), 1735-41.

Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Vazquez JL, 2001. Deep intrauterine insemination and embryo transfer in pigs. *Reprod Suppl*, 58, 301-11. Review.

Martinez EA, Vazquez JM, Roca J, Lucas X, Gil MA, Parrilla I, Vazquez JL, Day BN, 2002. Minimum number of spermatozoa required for normal fertility after deep intrauterine insemination in non-sedated sows. *Reproduction* Jan;123(1), 163-70.

Martinez EA, Caamaño JE, Gil MA, Rieke A, Mccauley TC, Cantley TC, et al, 2004. Successful nonsurgical deep uterine embryo transfer in pigs. *Theriogenology*;61,137-46.

Martinez EA, Vazquez JM, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Rodriguez-Martinez H, Roca J, Vazquez JL, 2006. Incidence of unilateral fertilizations after low dose deep intrauterine insemination in spontaneously ovulating sows under field conditions. *Reprod Domest Anim* Feb;41(1), 41-7.

Matwee, C., Kamaruddin, M., Betts, D.H., Basrur, P.K., King, W.A., 2001. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Mol. Hum. Reprod.* 7, 829–837.

Maxwell WM, Welch GR, Johnson LA, 1996. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 8, 1165-1168.

Maxwell WM, Johnson LA, 1997. Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*, 46, 408-418.

Maxwell WM, Long CR, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR, 1998. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, 10, 433-440.

Maxwell WMC, Johnson LA, 1999. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology* 52, 1353–1362.

Maxwell WM, Evans G, Hollinshead FK, Bathgate R, De Graaf SP, Eriksson BM, Gillan L, Morton KM, O'Brien JK 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. *Anim Reprod Sci*, 82-83, 79-95.

Moruzzi J.F. (1979). Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 57(2), 319-323.

Nebel RL, Bame JH, Saacke RG, Lim F, 1985. Microencapsulation of bovine spermatozoa. *Journal of animal science* 60(6), 1631-1639.

Nebel RL, Vishwanath R, McMillan W, Saacke RG, 1993. Microencapsulation of bovine spermatozoa for use in artificial insemination: a review. *Reproduction fertility development* 5, 701-712.

Nebel RL, Vishwanath R, McMillan W, Pitt CJ, 1996. Microencapsulation of bovine spermatozoa: effect of capsule membrane thickness on spermatozoal viability and fertility. *Animal Reproduction Science* 44, 79-89.

Nebel RL e Saacke RG, 1996. Spermatozoa microencapsulation and capsule behavior in the female tract. *Reproduction in domestic animals* 31, 75-85.

Parrilla I, Vazquez JM, Cuello C, Gil MA, Roca J, Di Berardino D, Martinez EA, 2004. Evaluation of genotoxic effect induced by Hoechst 33342 staining and ultraviolet laser exposure on flow cytometrically sorted boar spermatozoa. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. *Reproduction*, 128, 615-621.

Parrilla I, Vazquez JM, Gil MA, Caballero I, Almiñana C, Roca J, Martinez EA, 2005. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*. Jul 1;64(1),86-98.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H, 2003. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci*. Sep 15;78(1-2),85-98.

Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H, 2004. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. *Zygote*. May;12(2),117-24.

Peña FJ, Saravia F, Núñez-Martínez I, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H, 2006. Do different portions of the boar ejaculate vary in their ability to sustain cryopreservation? *Anim Reprod Sci*. Jun;93(1-2),101-13.

Perez-Pe R, Cebrian-Perez JA, Muiño-Blanco T, 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology* 56, 425-434.

Petrunkina AM, Volker G, Brandt H, Töpfer-Petersen E, Waberski D, 2005. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenology*. Nov;64(8),1766-82.

Petrunkina AM, Waberski D, Günzel-Apel AR, Töpfer-Petersen E, 2007. Determinants of sperm quality and fertility in domestic species. *Reproduction*. Jul;134(1), 3-17. Review.

Petters RM, Wells KD, 1993. Culture of pig embryos. *J Reprod Fertil*;48, 61–73.

Pinkel D, Lake S, Gledhill BL, Van Dilla MA, Stephenson D, Watchmaker G, 1982. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. *Cytometry*, 3(1), 1-9.

Probst S, Rath D, 2003. Production of piglets using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with flowcytometrically sorted boar semen and artificially activated oocytes. *Theriogenology*;59, 961–73.

Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL, 1972. Interaction of extender composition and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci*. Sep;35(3), 580-4.

Rath D, Johnson LA, Welch GR, 1993. In vitro culture of porcine embryos: development to blastocysts after in vitro fertilization (IVF) with flow cytometrically sorted and unsorted semen. *Theriogenology*;39, 293 [abstr.].

Rath D, Johnson LA, Dobrinsky JR, Welch GR, Niemann H, 1997. Production of piglets preselected for sex following in vitro fertilization with X and Y chromosome-bearing spermatozoa sorted by flow cytometry. *Theriogenology*; 47, 795–800.

Rath D, Long CR, Dobrinsky JR, Schreier LL, Welch GR, Johnson LA, 1999. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high speed sorting of X-chromosome bearing sperm to produce piglets after embryo transfer. *J Anim Sci*;77, 3346–52.

Rath D, Ruiz S, Sieg B, 2003. Birth of female piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. *Vet Rec. Mar 29*;152(13), 400-1.

Rens W, Welch GR, Johnson LA, 1998. A novel nozzle for more efficient sperm orientation to improve sorting efficiency of X- and Y- chromosome-bearing sperm. *Cytometry*, 33, 476-481.

Rens W, Welch GR, Johnson LA, 1999. Improved flow cytometric sorting of X- and Y-chromosome bearing sperm: substantial increase in yield of sexed sperm. *Mol Reprod Dev*, 52, 50-56.

Risopatron J, Sanchez R, Sepulveda N, Peña P, Villagran E, Miska W, 1995. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine in vitro fertilization: comparison with washing/ centrifugation. *Theriogenology*;46, 65–73.

Roberts KP, Wamstad JA, Ensrud KM, Hamilton DW, 2003. Inhibition of capacitation-associated tyrosine phosphorylation signaling in rat sperm by epididymal protein Crisp-1. *Biol Reprod. Aug*;69(2), 572-81.

Roca J, Rodríguez MJ, Gil MA, Carvajal G, Garcia EM, Cuello C, Vazquez JM, Martinez EA, 2005. Survival and in vitro fertility of boar spermatozoa frozen in the presence of superoxide dismutase and/or catalase. *J Androl.* Jan-Feb;26(1), 15-24.

Roca J, Hernández M, Carvajal G, Vázquez JM, Martínez EA, 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci.* Oct;84(10), 2692-9.

Rodríguez-Martínez H, Barth AD, 2007. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl.*;64, 39-54.

Rodríguez-Martínez H, Wallgren M, 2010. Advances in boar semen cryopreservation. *Vet Med Int.* Aug 25; pii: 396181.

Santoro MG, 2000. Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem. Pharmacol.*;59, 55– 6.

Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB, 2007. alpha-Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology.* Oct 15;68(7), 958-65.

Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB, 2009. Protein tyrosine phosphorylation under capacitating conditions in porcine fresh spermatozoa and sperm cryopreserved with and without alpha tocopherol. *Andrologia.* Jun;41(3), 184-92.

Seidel, G.E., Allen, C.H., Johnson, L.A., Holland, M.D., Brink, Z., Welch, G.R., Graham, J.K., Cattell, M.B., 1997. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non frozen and sexed spermatozoa. *Theriogenology* 48, 1255–1264.

Seidel Jr GE, Garner DL, 2002. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124, 733-743.

Sharpe JC, Evans KM, 2009. Advances in flow cytometry for sperm sexing. *Theriogenology*. Jan 1;71(1), 4-10.

Spinaci M, De Ambrogi M, Volpe S, Galeati G, Tamanini C, Seren E, 2005a. Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. *Theriogenology*, 64, 191-201.

Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, De Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G, 2005b. Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol. Reprod.Dev.* 72, 534–541.

Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, de Ambrogi M, Tamanini C, Seren E, Galeati G, 2006. Sperm sorting procedure induces a redistribution of Hsp70 but not Hsp60 and Hsp90 in boar spermatozoa. *J Androl.* Nov-Dec;27(6), 899-907.

Spinaci M, Volpe S, DeAmbrogi M, Tamanini C, Galeati G, 2008. Effects of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on in vitro maturation and fertilization of porcine oocytes. *Theriogenology* 15 (69(7)), 877–885.

Strzezek J, 2002. Secretory activity of boar seminal vesicle glands. *Reprod Biol.* Nov;2(3), 243-66. Review.

Szcześniak-Fabiańczyk B, Bochenek M, Smorag Z, Ryszka F, 2003. Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. *Reprod Biol.* Mar;3(1),81-7.

Torre ML, Maggi L, Giunchedi P, Conte U, Vigo D, Maffeo G, 1998. Calcium alginate capsules containing a hydrophilic polymer for the encapsulation of swine spermatozoa. *S.T.P. Pharma Sciences* 8(4), 233-236.

Torre ML, Maggi L, Vigo D, Galli A, Bornaghi V, Maffeo G, Conte U, 2000. Controlled release of swine semen encapsulated in calcium alginate beads. *Biomaterials* 21, 1493-1498.

Torre ML, Faustini M, Norberti R, Stacchezzini S, Maggi L, Maffeo G, Conte U, Vigo D, 2002b. Boar semen controlled delivery system: storage and in vitro spermatozoa release. *Journal of controlled release* 85, 83-89.

Trzcińska M, Bryła M, Smoraż Z, 2011. Apoptotic-like changes in the spermatozoa of fresh and stored boar semen and the quality of embryos produced in vivo. *Anim Reprod Sci. Mar*;124(1-2), 90-7.

Tsien RY, 1989. Fluorescent indicators of ion concentrations. In Taylor DL and Wang Y-L (eds): “Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture. Part B. Quantitative Fluorescence Microscopy—Imaging and Spectroscopy.” *Methods in Cell Biology*, Volume 30, Chapter 5. New York: Academic Press, pp 127–156.

Van Blerkom J, 1989. Encapsulation of sperm for artificial insemination. US Patent n°: US4840891

Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Gil MA, Lucas X, Roca J, 2002. Motility characteristics and fertilizing capacity of boar spermatozoa stained with Hoechst 33342. *Reprod Domest Anim. Dec*;37(6), 369-74.

Vazquez JM, Martinez EA, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Vazquez JL, 2003. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. *Theriogenology Apr* 1;59(7), 1605-14.

Vazquez JM, Martinez EA, Roca J, Gil MA, Parrilla I, Cuello C, Carvajal G, Lucas X, Vazquez JL, 2005. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the

value of deep intrauterine insemination. *Theriogenology*. Jan 15;63(2), 536-47. Review.

Vazquez JM, Matinez EA, Parrilla I, Cuello C, Gil MA, Garcia E, Caballero I, Almiñana C, Roca J, Vazquez JL, 2006. Improving the efficiency of laparoscopic intraoviductal insemination with sex-sorted boar spermatozoa. *Reprod Fertil Dev* 18, 283.

Vazquez JM, Roca J, Gil MA, Cuello C, Parrilla I, Caballero I, Vazquez JL, Martínez EA, 2008. Low-dose insemination in pigs: problems and possibilities. *Reprod Domest Anim*. Jul;43 Suppl 2, 347-54. Review.

Vazquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Martínez EA, 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology* Jan 1;71(1), 80-8. Review.

Vazquez JM, Parrilla I, Roca J, Gil MA, Cuello C, Vazquez JL, Martínez EA, 2009. Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: issues and perspectives. *Theriogenology*. Jan 1;71(1), 80-8. Review.

Vigo D, Faustini M, Torre ML, Pecile A, Villani S, Asti A, Norbert R, Maggi L, Conte U, Cremonesi F, Stacchezzini S, Maffeo G 2002a. Boar semen controlled-delivery system: morphological investigation and in vitro fertilization test. *Reproduction, fertility, and development* 14(5-6), 307-314.

Vigo D, Munari E, Scocca S, Torre ML, Faustini M, 2002b. Basi fisiologiche ed evoluzione dell'inseminazione strumentale nella scrofa. *Large Animals Review*, Anno 8, n° 6.

Vigo D, Faustini M, Villani S, Orisini F, Bucco M, Chlapanidas T, Conte U, Ellis K, Torre ML, 2009. Semen controlled release capsules allow a single artificial insemination in sows. *Theriogenology* 72, 439-444.

Villani S, Marazzi M, Bucco M, Faustini M, Klinger M, Gaetani P, Crovato F, Vigo D, Caviggioli F, Torre ML, 2008. Statistical approach in alginate membrane formulation for cell encapsulation in a GMP-based cell factory. *Acta Biomaterialia* 4, 943-949.

Vishwanath R, Shannon P, 1997. Do sperm cells age? A review of the physiological changes in sperm during storage at ambient temperature. *Reprod Fertil Dev.*;9(3),321-31.

Waberski D, Weitze KF, Rath D, Sallmann HP, 1989. Effect of bovine serum albumin and zwitterionic buffers on stored liquid boar semen. *Zuchthygiene* 24, 128–133.

Waberski D, Meding S, Dirksaen G, Weitze KF, Lewiding C, Hahn R, 1994a. Fertility of long term-stored boar semen: influence of extender (Androhep and Kiev), storage time and plasma droplets in the semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36, 145–151.

Waberski D, Magnus F, Ardón F, Petrunkina AM, Weitze KF, Töpfer-Petersen E, 2006. Binding of boar spermatozoa to oviductal epithelium in vitro in relation to sperm morphology and storage time. *Reproduction.* Feb;131(2), 311-8.

Waberski D, Petrunkina AM, Töpfer-Petersen E, 2008. Can external quality control improve pig AI efficiency? *Theriogenology.* Nov;70(8),1346-51.

Waterhouse KE, De Angelis PM, Haugan T, Paulenz H, Hofmo PO, Farstad W, 2004. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology.* Dec;62(9), 1638-51.

- Watson PF, 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7, 871–891.
- Watson PF, 1996. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. In: Rath, D., Johnson, L.A., Weitze, K.F. (Eds), *Boar Semen Preservation III. Proc. 3rd Int. Conf. Boar Semen Preservation, Mariensee, Germany, August, 1995.* *Reprod. Domest. Anim.* vol. 31 Blackwell, Berlin, pp. 135–140, (1).
- Watson PF, 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000 Jul 2;60-61, 481-92. Review.
- Weitze KF, Rath D, Baron G, 1987.[New aspects of preservation of boar sperm by deep freezing in plastic tubes]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1987 Sep;94(8), 485-6, 488.
- Weitze KF, 1990. The use of long-term extender in pig AI — a view of the international situation. *Pig News Information* 11 (1), 23–26.
- White IG, 1993. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod Fertil Dev.* 5(6), 639-58. Review.
- Yanagimachi R, 1994. Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill JK, (Eds.), *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York.
- Zini A, de Lamirande E, Gagnon C, 1993. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int. J. Androl.* 16, 183–188.

