

TITOLO DEL PROGETTO: Ematospermia nel cane e crioconservazione: effetto del trattamento del seme con centrifugazione su colloide

Docente tutor: Professoressa Barbara Merlo

Durata: 12 mesi

DESCRIZIONE DEL PROGETTO

La presenza di urina, materiale purulento o sangue conseguenti a patologie dell'apparato uro-genitale possono compromettere la qualità del materiale seminale in diverse specie mammifere [1, 2]. L'ematospermia, nello specifico, corrisponde alla presenza di sangue nell'eiaculato che assume un colore rosso in caso di presenza di emazie fresche o più tendente al marrone in corso di emolisi [3, 4].

L'ematospermia è un problema descritto in diversi mammiferi tra cui l'uomo [5, 6], il suino [7], il cavallo [8-10] e il cane [1, 3, 4]. In quest'ultimo la presenza di sangue nell'eiaculato si osserva principalmente in corso di iperplasia prostatica benigna che determina una contaminazione ematica del liquido prostatico, tuttavia può anche derivare da traumi a carico del pene e/o prepuzio durante il prelievo di sperma o l'accoppiamento naturale [4, 11]. Più raramente è stata descritta in cani giovani al primo prelievo di seme o in cani anziani con concomitante neoplasia testicolare [4].

L'ematospermia nel cane non determina necessariamente ipofertilità o infertilità. Difatti si è osservato che la presenza di sangue fino ad un 10% del volume dell'eiaculato non comporta nessuna alterazione della qualità del seme quando utilizzato fresco o refrigerato in monte naturali o inseminazioni artificiali vaginali [12]. Ma qualora si volesse procedere con la conservazione mediante congelamento, la presenza di una percentuale pari o superiore al 2% di sangue nell'eiaculato provoca un calo importante in termini di qualità del seme al momento dello scongelamento [12]. Ciò sembra essere legato alla liberazione dell'emoglobina a seguito dell'emolisi degli eritrociti durante il congelamento, che determina in primis un'alterazione dell'integrità della membrana degli spermatozoi, ma porta anche ad un calo della motilità e ad un'alterazione dell'acrosoma [12].

La centrifugazione su gradiente di densità colloidale è una tecnica che consente di separare le cellule in funzione della loro densità. Applicata allo sperma consente la separazione di spermatozoi motili, normali e con DNA integro dalla restante popolazione spermatica, permettendo inoltre di separarli da altre cellule presenti nel liquido spermatico ed eventuali patogeni [14]. È stata utilizzata con successo in campo umano [15] ed equino [14], permettendo di migliorare la qualità del seme e conseguentemente incrementare la percentuale di concepimento. Ad oggi, nella specie canina sono stati messi a confronto 4 media commerciali per la centrifugazione su gradiente di densità (Percoll, ISolate, PureCeption e PureSperm 100) con lo scopo di purificare il seme con esito promettente solo per quanto riguarda l'utilizzo del PureCeption [13].

Lo scopo di questa ricerca è quello di mettere a punto un protocollo di centrifugazione su gradiente di densità che permetta di ridurre/eliminare le emazie presenti nell'eiaculato di cani che presentano ematospermia, con l'obiettivo di ottenere uno sperma idoneo per il congelamento, al fine di conservare la linea genetica di quei riproduttori che altrimenti andrebbe persa.

Al fine della ricerca verranno testati diversi protocolli di centrifugazione su gradiente di densità su campioni di eiaculato con ematospermia e di eiaculati a concentrazioni note di contaminazione ematica. Ogni eiaculato verrà sottoposto a spermioγραμμα e

successivamente a centrifugazione mediante gradiente di densità. Il seme così trattato verrà nuovamente valutato, processato per il congelamento e conservato in azoto liquido. Successivamente verrà eseguita la prova di scongelamento con relativo spermogramma per valutare l'efficacia e l'effetto del trattamento sul materiale seminale crioconservato.

Bibliografia

1. Linde-Forsberg, C., Artificial insemination with fresh chilled extended and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg Small Anim*, 1995. **10**(1): p. 48-58.
2. Johnston, S., M. Root Kustritz, and P. Olsen, *Semen collection, evaluation and preservation*, in *Canine and feline theriogenology*, R. Kersey, Editor. WB Saunders Company: London. 2001, p. 287-306.
3. Seager, S., Semen collection and evaluation in the dog, in *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*, W. R, Editor. WB Saunders Company: London. 1986, p. 539-41.
4. Johnston, S., M. Root Kustritz, and P. Olsen, *Clinical approach to infertility in the male dog*, in *Canine and Feline Theriogenology*, R. Kersey, Editor. WB Saunders Company: London. 2001, p. 370-387.
5. Munkel, W., S. Krasnokutsky, J. Lie, S. Shah, et al., *Current perspectives on hematospermia: a review*. *J Androl*, 1997. **18**: p. 6-14.
6. Khodamoradi, K., M. Kuchakulla, M. Narasimman, Z. Khosravizadeh, et al., Laboratory and clinical management of leukocytospermia and hematospermia: a review. *Ther Adv Reprod Health*, 2020. DOI: 10.1177/2633494120922511.
7. Larsson, K., Evaluation of boar semen, in *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*, R. Wall, Editor. WB Saunders Company: London. 1986, p. 972-5.
8. Voss, J. and B. Pickett, Diagnosis, treatment of hemospermia in the stallion. *J Reprod Fertil Suppl*, 1975. **23**: p. 151-4.
9. Voss, J., B. Pickett, and R. Shideler, *The effect of hemospermia on fertility in horses*. *Proc 8th Int Congr Anim Reprod Artif Insemin*, 1976. **4**: p. 1093-5.
10. Bowen, J., Management of the breeding stallion, in *Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals*, W. R, Editor. WB Saunders Company: London. 1986, p. 635-45.
11. England, G. and W. Allen, Factors affecting the viability of canine spermatozoa. *Theriogenology*, 1992. **37**: p. 373-81.
12. Rijsselaere, T., A. Van Soom, D. Maes, S. Verberckmoes, et al., Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, 2004. **61**(7-8): p. 1589-602. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2003.09.008.
13. Phillips, T.C., G.K. Dhaliwal, K.M. Verstegen-Onclin, and J.P. Verstegen, Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. *Theriogenology*, 2012. **77**(1): p. 39-45. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.07.012.
14. Morrell, J.M., *Update on semen technologies for animal breeding*. *Reprod Domest Anim*, 2006. **41**(1): p. 63-7. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00621.x.
15. Bolton, V. and P. Braude, Preparation of human spermatozoa for in vitro fertilisation by isopycnic centrifugation of self-generating density gradients. *Arch Androl*, 1984. **13**: p. 167-176.