

# EFFETTO DEL SEX-SORTING SU ALCUNI PARAMETRI FUNZIONALI DEGLI SPERMATOZOI DI VERRO

## *EFFECT OF SEX-SORTING ON SOME FUNCTIONAL PARAMETERS OF BOAR SPERMATOZOA*

Bucci D.<sup>1</sup>, Galeati G.<sup>1</sup>, Tamanini C.<sup>1</sup>, Vallorani C.<sup>1</sup>, Rodriguez-Gil J. E.<sup>2</sup>, Spinaci M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna;*

<sup>2</sup>*Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat AUB, Barcelona, Spain.*

**Parole chiave:** spermatozoi, verro, sex-sorting, capacitazione

**Keywords:** spermatozoa, boar sex-sorting, capacitation

### **Riassunto**

Il sessaggio degli spermatozoi permette la predeterminazione del sesso del conceptus; tale tecnica presenta dei limiti dovuti alla bassa fertilità del seme dopo il processo. Lo scopo di questo lavoro è stato di analizzare presunte modificazioni simil-capacitative, che possono determinare una riduzione della qualità del seme in spermatozoi sessati di verro. I parametri valutati sono stati i pattern della colorazione CTC, l'organizzazione del citoscheletro di actina e la determinazione dei pattern di fosforilazione dei residui di tirosina; gli ultimi due parametri sono stati valutati sia con immunofluorescenza che con western blotting. Gli spermatozoi sessati (Sort) sono stati confrontati con spermatozoi "freschi" (F), capacitati (Cap) e dopo reazione acrosomiale (RA). Gli spermatozoi Sort hanno mostrato una distribuzione dei pattern CTC simile a quella dei Cap, così come la localizzazione dell'actina; l'espressione dell'actina, indagata con western blotting, non ha mostrato differenze. I pattern di fosforilazione dei residui di tirosina sono risultati inalterati negli spermatozoi Sort confrontati con gli F; inoltre, l'analisi con western blotting ha evidenziato alcune differenze qualitative tra tutti i trattamenti. I nostri risultati dimostrano che non tutte le modificazioni dei parametri studiati dopo sessaggio sono riconducibili alla capacitazione; in particolare si notano cambiamenti forti nel parametro più indicativo di modificazioni della membrana plasmatica.

### **Abstract**

Sperm sorting technology permits sex pre-selection, but it presents some troubles, due to low fertility after the process.

The main aim of this work was to analyze the putative existence of capacitation-like changes in boar sperm subjected to sex sorting that could lead to a detriment of semen quality. The parameters used were CTC staining patterns, actin cytoskeleton organization and tyrosine phosphorylation patterns; the last two were determined by both western blotting and immunofluorescence. Sex sorted (Sort) spermatozoa were compared with fresh (F), capacitated (Cap) and acrosome reacted (AR) sperm. Sort sperm showed a CTC staining pattern similar to that observed in Cap, as well as actin pattern distribution. However, actin expression analysis through western blot did not show any change.

The tyrosine phosphorylation pattern was practically unaltered after the sex sorting process; additionally, western blotting analysis evidenced some differences in the expression of protein tyrosine phosphorylation among the different groups.

Our results indicate that not all the sex-sorted related modification of the studied parameters were similar to that occurred after “in vitro” capacitation, thus suggesting that sex sorting-induced alterations of sperm function and structure are not necessarily indicating the achievement of the capacitated status.

### **Introduzione**

Il processo di sessaggio degli spermatozoi induce svariati danni strutturali e funzionali che possono diminuire la possibilità di conservazione e la fertilità, in particolar modo nel maiale, mentre altre specie sembrano meno sensibili (De Graaf et al., 2009; Vazquez et al., 2009; Rath et al., 2009). Queste modificazioni sono imputabili a una serie di fattori legati al processo di sessaggio (Rath et al., 2009; Maxwell et al., 1997; Maxwell e Johnson, 1999; Johnson, 2000). Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che il sessaggio induce cambiamenti simil-capacitativi negli spermatozoi, particolarmente evidenti nella distribuzione dei pattern del saggio CTC (Maxwell et al., 1997; Maxwell e Johnson, 1997; Maxwell et al., 1998).

La capacitazione è un processo cui gli spermatozoi vanno incontro nel tratto genitale femminile, che consiste nell’acquisizione della capacità di legarsi ad un oocita, penetrarne la zona pellucida e fertilizzarlo (Yanagimachi, 2008). Tra le modificazioni che la cellula subisce vanno ricordate: l’attivazione del pattern iperattivato della motilità (Yanagimachi, 2008), cambiamenti nella fluidità di membrana (Flesch e Gadella., 2000; Gadella, 2008), entrata di ioni bicarbonato (Harrison e Gadella., 2005) e calcio, (Flesch e Gadella., 2000), attivazione delle protein chinasi (Flesch e Gadella, 2000), fosforilazione dei residui di tirosina di alcune proteine (Flesch e Gadella, 2000; Urner e Sakkas, 2003; Vadnais et al., 2007) e riorganizzazione del citoscheletro di actina (Breitbart et al., 2005). La capacitazione “in vitro” (CIV) e la reazione acrosomiale (RAIV) necessitano di diverse sostanze stimolanti a seconda della specie: nel verro il bicarbonato e la BSA (bovine serum albumine) sono importanti induttori della capacitazione (Harrison e Gadella, 2005). La RAIV è stata indotta sia con zone pellucide solubilizzate che con l’aggiunta nel medium di incubazione del calcio ionoforo A23187 (Berger et al., 1989; Byrd, 1981).

La fosforilazione dei residui di tirosina è ritenuta uno degli eventi più tardivi del processo capacitativo e varie proteine della coda e della testa dello spermatozoo sono fosforilate nei residui di tirosina in presenza di condizioni capacitative o in media pro-capacitanti (Urner e Sakkas, 2003; Bailey et al., 2005; Grasa et al., 2009). Inoltre, il rimodellamento del citoscheletro di actina è uno degli eventi più evidenti durante la capacitazione e la reazione acrosomiale (Breitbart et al., 2005; Castellani-Ceresa et al., 1992, 1993; Brener et al., 2003).

Lo scopo del presente studio è stato di determinare se il processo di sessaggio degli spermatozoi di verro induca dei cambiamenti nell’organizzazione del citoscheletro, nella fosforilazione delle proteine nei residui di tirosina e nella colorazione CTC, che possano essere riconducibili alle modificazioni osservate in seguito a CIV o RAIV.

### **Materiali E Metodi**

Tutti i reagenti utilizzati sono stati ottenuti dalla Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), tranne laddove diversamente specificato.

Il seme è stato prelevato da tre verri sessualmente maturi (frazione ricca) di provata fertilità mediante la tecnica della mano guantata; dopo la raccolta il seme è stato diluito con il medium specifico (Androhep™) per essere trasportato in laboratorio entro un’ora

dalla raccolta. Per ridurre l'effetto individuale i campioni sono stati mescolati in pool. Aliquote di seme diluito sono state chiamate "Fresco".

La concentrazione dei campioni è stata valutata mediante una camera emocitometrica (Camera Thoma, Merck, Leuven, Belgio).

Il seme è stato lavato in medium di Brackett & Oliphant (Brackett e Oliphant, 1975) mediante due successive centrifugazioni a 800 x g per 3 minuti. Il pellet così ottenuto è stato diluito in medium per IVF, costituito da medium di Brackett & Oliphant, con 12% di siero fetale bovino (FCS-Gibco, Invitrogen, Italia). Gli spermatozoi (ad una concentrazione di  $100 \times 10^6$  cellule/mL) sono stati incubati a 39°C in atmosfera modificata con 5% CO<sub>2</sub> per 4 ore per indurre la capacitazione (CIV); la reazione acrosomiale è stata indotta con l'aggiunta di A23187 per 20 min a una concentrazione finale di 10 mM (RAIV).

La vitalità del seme è stata valutata mediante colorazione con SYBR Green 14 Ioduro di Propidio come descritto da Spinaci et al. (2005).

Per determinare il grado di capacitazione e la reazione acrosomiale gli spermatozoi sono stati testati con la colorazione con clorotetraciclina (CTC), un colorante che ha affinità per i siti leganti il calcio (Mattioli et al., 1996; Maxwell e Johnson, 1997). Tre diversi pattern di colorazione sono stati distinti, come già descritto (Mattioli et al., 1996; Maxwell e Johnson, 1997): F) fluorescenza equamente distribuita in tutta la testa, tipica degli spermatozoi freschi; B) fluorescenza circoscritta alla zona acrosomiale e assenza nella zona post acrosomiale, tipica degli spermatozoi capacitati; AR) fluorescenza circoscritta alla linea/banda equatoriale, tipica delle cellule dopo reazione acrosomiale.

#### Western Blotting

Pellets di spermatozoi ( $100 \times 10^6$  spz) sono stati sonicati in 100 µL di buffer di omogeneizzazione (50 mM Tris-HCl buffer pH7,4 contenente 1mM EDTA, 10 mM EGTA, 25 mM DTT, 1,5% (w/v) Triton X-100, 1 mM PMSF, antiprotease cocktail). I campioni sono stati successivamente centrifugati a 12000 x g per 15 min a 4°C ed i surnatanti così ottenuti sono stati conservati per la determinazione del contenuto di proteine. Per quanto riguarda l'actina, è stata eseguita una precipitazione in acetone, come descritto da Flores et al. (2010). Per determinare la quantità di proteine nel campione è stato utilizzato il metodo Bradford (Bradford, 1976) utilizzando un kit commerciale (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA); i campioni sono poi stati conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

L'elettroforesi è stata eseguita utilizzando un sistema Invitrogen Xcell Surelock, gel al 10% di Bis-Tris glicina e come tampone per la corsa è stato utilizzato il MOPS; in ogni pozzetto è stato caricato un volume di campione equivalente a 20 µg di proteina.

In seguito si è effettuato il trasferimento su membrana di nitrocellulosa con il sistema per blotting Invitrogen Xcell Surelock Blot Module con tampone di trasferimento a pH 7,2.

Le membrane sono state quindi lavate velocemente in PBS e i legami proteici non-specifici sono stati bloccati con una soluzione costituita da PBS-T20 (PBS 0,1% Tween 20) con il 2,5% di BSA per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono state incubate overnight con l'anticorpo monoclonale anti tirosina-fosforilata (Upstate Millipore, Watford, UK), diluito 1:10000 ed anti actina (Sigma) diluito 1:500 in TBS-T20 (Tris-buffered solution, (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl) 0,1% Tween 20) a 4°C. Dopo diversi lavaggi con il PBS-T20 le membrane sono state incubate a temperatura ambiente con anticorpi secondari biotina-coniugati anti-mouse diluito 1:10000 (Bioxfix Laboratories, Owing Mills, MD, USA) per fosfo-tirosina ed anti-rabbit diluito 1:20000 (Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, MI, USA) per actina per 1 ora.

In seguito ad altri lavaggi le membrane sono state incubate con anticorpi anti-biotina

diluiti 1:1000, HRP (horseradish peroxidase)-coniugati (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA). I campioni di controllo sono stati trattati allo stesso modo con l'omissione dell'anticorpo primario. I western blots sono stati rivelati utilizzando il kit Super signal west pico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) come da istruzioni della casa produttrice.

Le membrane sono state in seguito ritestate per la  $\beta$ -tubulina per verificare che fosse stata caricata la stessa quantità di proteina.

### Immunofluorescenza

Tutte le procedure sono state condotte a temperatura ambiente, salvo diversa indicazione. Campioni di spermatozoi sono stati posti su un vetrino precedentemente trattato con poli L-lisina, fissati con metanolo a  $-20^{\circ}\text{C}$  per 5 min e successivamente con acetone per 30 sec. I vetrini sono poi stati lavati in PBS, lasciati asciugare ed incubati con blocking 10% (v/v) FCS (foetal calf serum) in PBS per 30 min. In seguito i vetrini sono stati incubati overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  con gli anticorpi anti fosfotirosina ed anti actina diluiti in blocking. Dopo vari lavaggi i campioni sono stati incubati 1 ora al buio con gli anticorpi secondari FITC-coniugati rispettivi (1:800 anti mouse per fosfotirosina, 1:2200 anti rabbit per actina).

Per controllare lo stato degli acrosomi i vetrini sono stati successivamente lavati in PBS, incubati 15 min al buio con PNA (agglutinina dell'arachide) TRITC-coniugata (10 mM) e lavati. Infine i vetri sono stati incubati per 5 min con Hoechst 33342 al buio per contro colorare i nuclei e montati con medium "anti-fading" Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). I campioni di controllo sono stati trattati allo stesso modo con l'omissione degli anticorpi primari. Le immagini sono state ottenute mediante un microscopio ad epifluorescenza Nikon.

Ogni campione è stato analizzando contando almeno 200 cellule per definire i diversi pattern di positività e delineare la loro distribuzione fra i vari gruppi.

### Analisi Statistica

Per ogni campione sono stati valutati almeno 200 spermatozoi; ogni esperimento è stato ripetuto 5 volte. I risultati sono espressi come media  $\pm$  errore standard.

I dati sono stati sottoposti a test di Kolmogorof-Smirnoff per determinare la loro distribuzione che è risultata essere normale. In seguito è stata eseguita una ANOVA con successivo post-hoc test di Bonferroni per determinare le differenze tra gruppi. Il valore di significatività è stato fissato a 0,05. Il software utilizzato è stato Macintosh SPSS 11.

### Risultati

La frazione ricca degli eiaculati aveva una concentrazione di  $37,3 \pm 6,4 \times 10^7$  sperm/mL; la vitalità degli spermatozoi freschi è risultata pari a  $91,3 \pm 2\%$ .

La variazione dei pattern di CTC (F, B, AR descritti precedentemente) in conseguenza dei diversi trattamenti è riportata nella tabella 1.

Risulta evidente un aumento della percentuale di spermatozoi con pattern B dopo CIV e RAIV, mentre un incremento chiaro del pattern AR è evidente solo nel gruppo RAIV. Il gruppo Sortati evidenzia un aumento della percentuale delle cellule che esprimono il pattern B con una conseguente diminuzione del pattern F; questo risultato è simile a quanto osservato dopo CIV.

**Tabella 1.** Pattern della colorazione CTC in spermatozoi di verro Freschi, dopo CIV e RAIV e Sortati.

CTC pattern	Freschi	CIV	RAIV	Sortati
F (%)	92,6±1,3 <sup>a</sup>	67,7± 2,9 <sup>b</sup>	7,3±1,3 <sup>c</sup>	68,6±1,3 <sup>b</sup>
B (%)	5,3±1,3 <sup>a</sup>	24,3±2,6 <sup>b</sup>	46,7±7 <sup>c</sup>	25,6±1,1 <sup>b</sup>
AR (%)	2,1±1,7 <sup>a</sup>	8,0±1,5 <sup>a</sup>	46,0±7.6 <sup>b</sup>	5,8±0,3 <sup>a</sup>

I valori sono espressi come media ± S.E.M di almeno 5 replicati. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere in apice per riga.

#### Caratterizzazione Dei Pattern Di Actina E Fosfotirosina

##### Actina

I tre seguenti pattern sono stati caratterizzati con l'immunofluorescenza:

- A) positività a livello acrosomiale e nella linea/banda equatoriale;
- B) positività dell'acrosoma e della banda post-equatoriale accompagnata da un aumento della positività della coda;
- C) positività della banda post-equatoriale e della coda.

La distribuzione dei diversi pattern nei vari trattamenti è riportata nella tabella 2.

Un cambio nella distribuzione delle subpopolazioni di cellule che esprimono i diversi pattern di actina è stato osservato dopo CIV e RAIV. Questo cambio comprende un aumento del pattern B dopo CIV ed un incremento del pattern C dopo RAIV. Negli spermatozoi Sessati si nota una differenza significativa per il pattern A, quando comparati con i Freschi, mentre gli altri pattern non differiscono.

**Tabella 2.** Distribuzione dei pattern di actina negli spermatozoi di verro Freschi, dopo CIV, RAIV e Sortati.

Pattern Actina	Freschi	CIV	RAIV	Sortati
A (%)	91,8±0,7 <sup>a</sup>	21,3±6,3 <sup>b</sup>	5,1±0,8 <sup>b</sup>	61,4±8,6 <sup>c</sup>
B (%)	5,8±0,5 <sup>a</sup>	70,4±5,1 <sup>b</sup>	24,5±2,3 <sup>a</sup>	28,9±8,6 <sup>a</sup>
C (%)	2,4± 0,2 <sup>a</sup>	8,3±1,2 <sup>a</sup>	70,5±3,8 <sup>b</sup>	5,8±1,0 <sup>a</sup>

I valori sono espressi come media ± S.E.M di almeno 5 replicati. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere in apice per riga.

#### Fosoforilazione Dei Residui Di Tirosina

Gli spermatozoi hanno mostrato i seguenti pattern di positività:

- A) positività diffusa nell'acrosoma e una positività triangolare sub segmento equatoriale;
- B) la positività a livello equatoriale è triangolare o diffusa; appare una positività nella parte principale e finale della coda; è conservata la positività acrosomiale;
- C) positività del segmento equatoriale e della coda.

Nella tabella 3 si nota una prevalenza del pattern A nelle cellule Fresche, mentre i pattern B e C prevalgono rispettivamente nelle cellule dopo CIV e RAIV. Gli spermatozoi Sortati presentano una distribuzione dei pattern simile a quella dei Freschi, con un aumento significativo del pattern C.

**Tabella 3.** Distribuzione dei pattern di tirosina fosforilata negli spermatozoi di verro Freschi, dopo CIV, RAIV e Sortati.

Pattern tirosina	Freschi	CIV	RAIV	Sortati
A (%)	88,2±3,7 <sup>a</sup>	19,4±5,4 <sup>b</sup>	2,9±0,7 <sup>c</sup>	80,3±3,3 <sup>a</sup>
B (%)	9,2±3,1 <sup>a</sup>	68,9±5,8 <sup>b</sup>	17,8±2,7 <sup>a</sup>	8,3±3,3 <sup>a</sup>
C (%)	2,6±1,0 <sup>a</sup>	11,7±0,4 <sup>b</sup>	79,6±2,1 <sup>c</sup>	11,5±2,8 <sup>b</sup>

I valori sono espressi come media ± S.E.M di almeno 5 replicati. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere in apice per riga.

#### Western blotting

Per quanto riguarda l'actina è stata osservata una banda di 42 KDa e nessuna differenza è risultata significativa a seguito dei trattamenti.

Per quanto riguarda la fosforilazione dei residui di tirosina, è stata osservata una differenza qualitativa tra spermatozoi Freschi, CIV, RAIV e Sortati.

In queste condizioni sperimentali non si sono evidenziate delle differenze per quanto riguarda la p32, che è considerata un marker di capacitazione, anche se generalmente nei CIV e RAIV si nota un lieve incremento. Nelle cellule RAIV è evidente a 25 kDa una banda molto forte, mentre le altre bande sono più deboli. Nei lisati degli spermatozoi Sortati sono evidenti due bande distinte a 23 e 25 KDa, con l'ultima più marcata.

#### Discussione

Lo scopo di questo lavoro era di verificare se il processo di sessaggio degli spermatozoi induce cambiamenti simil-capacitativi negli spermatozoi di maiale.

Gli spermatozoi sessati di verro hanno evidenziato una distribuzione dei pattern del CTC simile a quella delle cellule dopo CIV; questi risultati sono concordi con altri studi (Maxwell e Johnson, 1997). Quegli Autori hanno ipotizzato che il cambiamento sia dovuto alla diluizione e alla successiva centrifugazione degli spermatozoi (quest'ultimo considerato come un passaggio pre-capacitante), ma non sono convinti che l'entità dei cambiamenti possa essere definita capacitante in senso stretto, perché la capacitazione in vitro degli spermatozoi del maiale necessita del bicarbonato nel medium di incubazione (Maxwell e Johnson, 1997).

L'induzione di cambiamenti simil-capacitativi da parte delle tecnologie applicate alla riproduzione animale come il sessaggio e la crioconservazione è un campo aperto: finora gli spermatozoi sessati sono stati analizzati solo con la tecnica del CTC e questo è il primo studio che applica nuovi parametri.

Il rimodellamento del citoscheletro è stato descritto precedentemente da altri Autori (Brener et al., 2003) in spermatozoi di toro, topo, uomo ed ariete con la colorazione con falloidina FITC-coniugata. I suddetti autori hanno descritto una organizzazione dell'actina in filamenti (F actina) durante la capacitazione ed una successiva depolimerizzazione alla fine

della reazione acrosomiale. Due articoli di Castellani-Ceresa e collaboratori (1992, 1993) hanno dimostrato il possibile ruolo dell'actina nell'acquisizione della capacità fecondante da parte degli spermatozoi di verro. I nostri dati sono simili a quanto riportato da Colas et al. (2009) riguardo alla distribuzione dell'actina in spermatozoi Freschi e dopo CIV e RAIV. Negli spermatozoi Sessati il pattern A prevale sugli altri due, ma è statisticamente inferiore a quanto osservato nei Freschi; si può perciò ritenere che il processo di sessaggio determini un cambiamento, che però è di minore intensità di quello prodotto dal CIV e dalla RAIV. Lo stesso andamento è stato descritto da Flores et al. (2010) in spermatozoi di verro congelati e scongelati messi a confronto con cellule appena eiaculate. Si può quindi suggerire che l'organizzazione dell'actina negli spermatozoi di verro sia influenzata dalle tecnologie applicate alla riproduzione.

L'altro parametro che abbiamo studiato è la modificazione dello stato di fosforilazione dei residui di tirosina delle proteine.

I diversi pattern che abbiamo descritto con l'immunofluorescenza sono simili a quanto già riportato nel verro (Jones et al. 2008; Tardif et al., 2001). L'analisi con western blotting degli spermatozoi sessati ha evidenziato poche differenze con i Freschi; inoltre nessuna differenza è registrabile all'immunofluorescenza tra i pattern degli spermatozoi freschi e sessati, con l'eccezione del pattern AR.

La modificazione dei pattern del CTC, che sono legati all'entrata del calcio nella cellula, può essere spiegata con l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti a causa del forte campo elettromagnetico prodotto dalla macchina, che non determina però un'attivazione effettiva di tutta la cascata di eventi intracellulari. Il coinvolgimento del campo elettromagnetico è stato descritto da Rath e collaboratori (2009) ed anche Spinaci et al. (2010) hanno riportato una situazione simile negli spermatozoi di verro dopo refrigerazione e riscaldamento. Studi precedenti hanno inoltre dimostrato una riorganizzazione dell'espressione delle proteine Heat shock 70 (Hsp70) dopo sessaggio (Spinaci et al., 2006). L'espressione di questa proteina diminuisce durante la conservazione liquida degli spermatozoi di verro probabilmente a causa di un effettivo consumo (Spinaci et al., 2010). Va sottolineato che Hsp70 e colorazione CTC sono due parametri legati alla membrana che cambiano profondamente a seguito del processo di sessaggio, assumendo pattern simili al seme capacitato (Maxwell et al., 1997; Spinaci et al., 2006, 2010; Maxwell e Johnson, 1997; Maxwell et al., 1998).

Come già riportato, le tecnologie come il sessaggio e la crioconservazione sono ritenute in grado di attivare in senso capacitativo gli spermatozoi nel maiale (Green e Watson, 2001; Bravo et al., 2005). In questa specie il raffreddamento e il riscaldamento inducono uno stato capacitativo efficace nell'inizializzare la reazione acrosomiale (Green e Watson, 2001; Bravo et al., 2005; Kaneto et al., 2002). C'è tuttavia una differenza tra la vera capacitazione indotta in condizioni appropriate in vitro o in vivo, e la "falsa" capacitazione, che può essere ritenuta uno stato degli spermatozoi determinato da cause stressanti.

Non possiamo definire chiaramente questa situazione dopo sessaggio, perché i nostri dati dimostrano che alcuni parametri (soprattutto CTC ed in minor parte l'actina) vanno incontro a modificazioni simil-capitative, mentre la fosforilazione dei residui di tirosina non lo fa. Interessante è notare che gli spermatozoi sessati di maiale sono molto efficaci nella fertilizzazione in vitro senza la pre-incubazione in condizioni capacitanti (Rath et al., 1999; Spinaci et al., 2005), suggerendo quindi che il processo induca una vera capacitazione.

In conclusione questo studio ha esaminato negli spermatozoi sessati di verro alcuni parametri legati alla capacitazione ed abbiamo dimostrato che i cambiamenti di membrana sono simili a quelli che avvengono a seguito della capacitazione e che questi cambiamenti sono principalmente dovuti a una destabilizzazione della membrana stessa. La riorganizzazione

del citoscheletro di actina e la fosforilazione dei residui di tirosina hanno dimostrato di essere meno suscettibili di cambiamenti a seguito del processo di sessaggio, anche se sono state osservate alcune modificazioni nella distribuzione delle subpopolazioni.

## **Bibliografia**

Bailey J.L., Tardif S., Dubé C., Beaulieu M., Reyes-Moreno C., Lefièvre L., Leclerc P. (2005) Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. *Theriogenology*. 63(2), 599-614.

Berger T., Turner K.O., Meizel S., Hedrick J.L. (1989) Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod*. 40(3), 525-30.

Brackett B.G., Oliphant G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 12, 260-74.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.

Bravo M.M., Aparicio I.M., Garcia-Herreros M., Gil M.C., Peña F.J., Garcia-Marin L.J. (2005) Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 71(1), 88-96.

Breitbart H., Cohen G., Rubinstein S. (2005) Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Rev Reprod*. 129(3), 263-268.

Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H. (2003) Remodeling of actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 68, 837-845.

Byrd W. (1981) In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J Exp Zool*. 215(1), 35-46.

Castellani-Ceresa L., Brivio M.F., Radaelli G. (1992) F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 33, 99-107.

Castellani-Ceresa L., Mattioli M., Radaelli G., Barboni B., Brivio M. F. (1993) Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Mol Reprod Dev*. 36, 203-211.

Colás C., Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez L.A. (2009) Changes in actin distribution of ram spermatozoa under different experimental conditions. *Theriogenology*. 44, 221-227.

De Graaf S.P., Beilby K.H., Underwood S.L., Evans G., Maxwell W.M.C. (2009) Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology*. 71, 89-97.

Flesch F.M., Gadella B.M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469(3), 197-213.

- Flores E., Fernández-Novell J.M., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2010) Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. *Theriogenology*. 74, 354-63.
- Fraser L.R., Abeydeera L.R., Niwa K. (1995) Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev*. 40(2), 233-241.
- Gadella B.M. (2008) Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci*. 107, 229-236.
- Green C.E., Watson P.F. (2001) Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*. 122(6), 889-898.
- Harrison R.A.P., Gadella B.M. (2005) Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 62, 342-351.
- Johnson L.A. (2000) Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*. 60-61, 93- 107.
- Jones R., James P.S., Oxley D., Coadwell J., Suzuki-Toyota F., Howes E. (2008) The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biol Reprod*. 79(3), 421-431.
- Kaneto M., Harayama H., Miyake M., Kato S. (2002) Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci*. 73(3-4), 197-209.
- Mattioli M., Barboni B., Lucidi P., Seren E. (1996) Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*. 45(2), 373-381.
- Maxwell W.M., Johnson L.A. (1997) Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*. 46, 408-418.
- Maxwell W.M., Welch G.R., Johnson L.A. (1997) Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 8, 1165-1178.
- Maxwell W.M., Long C.R., Johnson L.A., Dobrinsky J.R., Welch G.R. (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*. 1, 433-440.
- Maxwell W.M., Johnson L.A. (1999) Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*. 52 1353-1362.
- Rath D., Long C.R., Dobrinsky J.R., Welch G.R., Schreier L.L., Johnson L.A. (1999) In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci*. 77, 3346-3352.

Rath D., Moench-Tegeder G., Taylor U., Johnson L.A. (2009) Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology*. 71, 22-29.

Spinaci M., De Ambrogi M., Volpe S., Galeati G., Tamanini C., Seren E. (2005) 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. (2006) Sperm sorting procedure induces a redistribution of Hsp70 but not Hsp60 and Hsp90 in boar spermatozoa. *J Androl.* 27(6), 899-907.

Spinaci M., Vallorani C., Bucci D., Bernardini C., Tamanini C., Galeati G. (2010) Effect of liquid storage on sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*. 74, 741-748.

Tardif S., Dubé C., Chevalier S., Bailey J.L. (2001) Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.* 65(3), 784-792.

Urner F., Sakkas D. (2003) Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* 125, 17-26.

Vadnais M.L., Galatino-Homer H.L., Althouse G.C. (2007) Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl.* 53, 109-123.

Vazquez J.M., Parrilla I., Roca J., Gil M.A., Cuello C., Vazquez J.L., Martínez E.A. (2009) Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: Issues and perspectives. *Theriogenology*. 71, 80-88.

Yanagimachi R., (2008) Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neil J. D. et al. *The physiology of reproduction*. Vol 1. New York Raven Press Ltd. 2008, pp 189-319.

Testo tratto dall'Articolo "Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa", Bucci et al., (2012) *Theriogenology*, 77, 1206-1216.