

Influenza di un'alimentazione integrata su qualità del seme e funzionalità endocrina nel cane riproduttore

RIASSUNTO

L'importanza che una dieta integrata con antiossidanti riveste sull'efficienza riproduttiva degli animali è ampiamente documentata. SCOPO dello studio è valutare l'effetto di una dieta addizionata di fitoterapici specifici, vitamine ed oligoelementi sull'efficienza riproduttiva in 14 cani maschi fertili suddivisi in quattro classi di età. Lo studio, durato circa otto mesi, si è articolato in due fasi, una fase PRE INTEGRAZIONE (dieta abituale) della durata di 90 giorni ed una fase CON INTEGRAZIONE (dieta secca arricchita) della durata di 135 giorni, considerando come giorno 0 (T_0) il giorno di inizio dell'alimentazione integrata. Per ciascuna fase sono stati effettuati, a distanza di 45 giorni, 3 prelievi ematici (T_{-3} , T_{-2} , T_{-1} - T_1 , T_2 , T_3) per valutare Testosterone Tst (ng/ml) e Tiroxina libera fT_4 (pg/ml) e 3 prelievi seminali per la valutazione quali-quantitativa. Sono stati eseguiti inoltre visita clinica e follow-up su eventuali variazioni comportamentali. L'analisi dei dati mette in evidenza un aumento dei dosaggi di fT_4 , Tst, entro 45 gg, positivi per la sfera riproduttiva. Non si evidenziano variazioni significative del peso corporeo; aumentano invece tonicità e massa muscolari. I dati sul comportamento mostrano un aumento della territorialità (80%) e dominanza (60%) dovuto all'aumento del testosterone. Si evidenziano significative risposte positive per i parametri di concentrazione, motilità e vitalità nel gruppo di soggetti 2-7 anni, periodo di maggiore attività riproduttiva. Tale fascia potrebbe rappresentare il target cui è mirata la dieta. Non si evidenziano effetti positivi sui soggetti anziani, probabilmente per l'invecchiamento tissutale e la minore attività metabolica. Gli incoraggianti risultati suggeriscono l'utilizzo di una dieta arricchita in allevamenti monitorati per migliorarne le performance produttive.

**P. Ponzio*, S. Canello[§], G. Guidetti[§],
M. Sergiacomo[°], C. Sferra*, E. Macchi***

*Dipartimento di Scienze Veterinarie,
Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO) - Italia

[°]Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie,
Università degli Studi di Teramo (TE) - Italia

[§]SANYpet S.p.A. - Via Austria, 3
35023 Bagnoli di Sopra (PD) - Italia

INTRODUZIONE

L'importanza che riveste una dieta integrata con antiossidanti sulla qualità del materiale seminale e sulla funzionalità riproduttiva in numerose specie animali, soprattutto di interesse economico (bovina, suina, equina e canina), nonché nell'uomo è documentata in recenti lavori scientifici^{7,13,18,19,21,24}. Nello specifico, gli effetti di questi integratori si ripercuotono positivamente sul fisiologico sviluppo dei tessuti strettamente correlati alle funzioni riproduttive³ e sulla struttura dello spermatozoo stesso salvaguardandone l'integrità della membrana cellulare e favorendone la concentrazione e la motilità. Inoltre i risultati ottenuti indicano che questi integratori possono incrementare la produzione di Testosterone, quest'ultima indotta dall'aumento della concentrazione plasmatica dell'ormone favorente il rilascio di Gonadotropine (GnRH) e di conseguenza la spermatogenesi ad opera del tessuto testicolare⁸. Per quanto riguarda il mantenimento della qualità dello sperma durante la spermatogenesi, lo stoccaggio epididimale e l'eiaculazione, alcuni studi indicano che c'è una relazione tra l'azione della vitamina E e la riduzione del danno cellulare²⁵. Nell'uomo è stato dimostrato che tale regime alimentare può essere proposto come un mezzo efficace per migliorare le performance riproduttive in caso di sub fertilità^{3,27,28}. Il successo riproduttivo che si può osservare integrando la dieta con alcuni elementi essenziali e fitofarmaci ad effetto anti ossidante è legato anche alle influenze che tali sostanze esercitano sull'attività metabolica. Tale attività è regolata dall'azione di alcune ghiandole, la principale delle quali è rappresentata dalla tiroide che influenza l'attività metabolica e contribuisce a regolare importanti funzioni dell'organismo quali ad esempio la crescita, l'attività cardiaca e l'attività riproduttiva⁹.

Alla luce del sempre maggiore interesse nel fornire una dieta arricchita per aumentare la qualità del seme questo studio si è proposto di confrontare le variazioni temporali endocrine e dei principali parametri quali-quantitativi del materiale seminale in rapporto all'impiego di una specifica dieta arricchita con fitoterapici specifici, vitamine ed oligoelementi.

MATERIALI E METODI

14 cani maschi di razze diverse, in particolare 5 Pastori Tedeschi, 2 Border Collie, 1 Pastore Belga, 1 Pastore Scozzese, 1 Cavalier King, 1 Saluki, 1 Bassotto, 1 Terranova, 1 Boxer routinariamente impiegati come donatori di seme¹⁹ sono stati scelti per lo studio dopo essere sta-

“Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 23/01/2013 ed accettato per la pubblicazione dopo revisione il 24/09/2013”.

Questo studio è stato sponsorizzato da SANYpet S.p.A. - Via Austria, 3 - 35023 Bagnoli di Sopra (PD) - Italia.

ti sottoposti a un esame obiettivo generale e a una visita clinica che escludesse la presenza di alterazioni anatomico-funzionali e comportamentali della sfera riproduttiva.

I soggetti, di età compresa tra 1 e 10 anni, sono stati suddivisi in quattro GRUPPI di età (1-2 anni, 3-4 anni, 5-7 anni, 8-10 anni) al fine di confrontare tutte le variabili analizzate per queste classi; un'ulteriore classe di età è stata individuata per raggruppare i soggetti di 2-7 anni in quanto tale periodo rappresenta il momento di maggiore attività nella carriera riproduttiva¹⁴. La suddivisione in gruppi è stata effettuata dopo aver verificato l'eventuale influenza del fattore età.

Lo studio, della durata di circa otto mesi, è stato condotto nel periodo estate/autunno per escludere la maggiore incidenza di attività riproduttiva nel cane domestico⁴ e si è articolato in due fasi: una fase PRE INTEGRAZIONE (dieta abituale) della durata di 90 giorni ed una fase CON INTEGRAZIONE (dieta secca arricchita) della durata di 135 giorni, considerando come giorno 0 (T_0) il giorno di inizio dell'alimentazione integrata.

Come evidenziato da Bobic *et al.*⁴, pur essendo descritta una certa influenza stagionale sull'attività riproduttiva, questa tuttavia risulta meno marcata in queste due stagioni e comunque meno condizionante rispetto a fattori ambientali e soprattutto gestionali (alimentazione, tipologia di allevamento) mantenuti uguali in tutti i soggetti dello studio.

1° fase PRE INTEGRAZIONE: i soggetti campione sono stati monitorati mantenendo la loro alimentazione con la dieta abituale.

Durante questa fase (basale) sono state effettuate n° 3 raccolte di materiale biologico ad intervalli di 45 giorni ($T_{-3} = -90$ gg da T_0 , $T_{-2} = -45$ gg da T_0 , $T_{-1} = -1$ gg da T_0), corrispondenti al periodo indicato in bibliografia per il completamento delle diverse fasi della spermatogenesi in questa specie¹⁰, tali raccolte prevedevano ciascuna 1 prelievo ematico ed 1 prelievo di materiale seminale.

2° fase CON INTEGRAZIONE: i soggetti impiegati nello studio sono stati alimentati con dieta secca arricchita con Fitoterapici specifici fornita dalla ditta SANYpet S.P.A. azienda specializzata in alimenti dietetici, nutraceutici e biologici mirati ai diversi momenti funzionali e/o carenziali per cani e gatti.

Durante questa fase sono state eseguite n° 3 raccolte di materiale biologico ad intervalli di 45 giorni ($T_1 = 45$ gg da T_0 , $T_2 = 90$ gg da T_0 , $T_3 = 135$ gg da T_0), tali raccolte prevedevano ciascuna 1 prelievo ematico ed 1 prelievo di materiale seminale.

Tutti i prelievi sono stati eseguiti per ogni soggetto con protocollo e metodologia standardizzata per ambiente, orario di prelievo ed assenza di femmina in calore.

Ad ogni seduta di prelievo i soggetti sono stati sottoposti ad esame obiettivo generale per la va-

lutazione dello stato di salute verificando, inoltre, l'assenza di somministrazione di farmaci nel periodo di studio. Inoltre per determinare il Body Condition Score (BCS) è stato effettuato un esame fisico associato all'osservazione visiva e alla palpazione assegnando un punteggio da 0-4^{15,17} e sono stati pesati per rilevare eventuali variazioni ponderali nell'arco dello studio.

Ad ogni seduta, inoltre, a seguito di un colloquio con i proprietari, è stato compilato un questionario riportante eventuali cambiamenti nei normali moduli comportamentali durante il periodo tra un prelievo ed il successivo indicante nello specifico:

- marcatura territorio: mai (0) / talvolta (1) / spesso (2),
- dominanza intraspecifica maschio/maschio: mai (0) / talvolta (1) / spesso (2),
- reattività al lavoro: diminuita (-1) / normale (0) / aumentata (1) / spiccata (2),
- docilità: indocile (-2) / poco collaborativo (-1) / inalterata (0) / aumentata (1).

I campioni ematici, raccolti mediante prelievo dalla vena radiale (cefalica), sono stati centrifugati (3500 rpm) ed il siero ottenuto è stato immediatamente congelato (-20°C) per le successive analisi ormonali. Le determinazioni ormonali hanno riguardato la concentrazione di ormoni sessuali e tiroidei: Testosterone - (T_{st} - ng/ml) e Tiroxina libera - (fT_4 - pg/ml) e sono state effettuate utilizzando kit immunoenzimatici (KSO002EV, KT7EV, RADIM S.p.A. - Pomezia - RM) validati sul cane.

Il materiale seminale è stato raccolto con stimolazione manuale (digital manipulation)^{6,19}, e solo la seconda frazione (frazione spermatica), mantenuta a temperatura di 37°C , è stata immediatamente esaminata per la determinazione dei seguenti parametri: Volume (ml) misurato mediante impiego di pipetta graduata, pH valutato, entro pochi minuti dal prelievo²³, mediante pHmetro (HI 3220 pH/ORP meter, Hanna Instruments), Concentrazione valutata mediante l'utilizzo di metodica standardizzata con la Camera di Bürker (spz x 10^6 / ml), Motilità (%) valutata mediante un Analizzatore computerizzato specifico per l'analisi seminale Computer Assisted Sperm Analyzer (CASA) system IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly MA, USA) settato per il cane^{12,26}, Vitalità (%) mediante l'esecuzione dell'Hypo Osmotic Swelling Test (HOS Test)²².

Dai valori ottenuti dai prelievi, T_{-3} , T_{-2} , T_{-1} per singolo soggetto e singolo parametro è stata effettuata la media denominata PRE INTEGRAZIONE. Da tutti i dati ottenuti dai prelievi T_1 - T_2 - T_3 per singolo soggetto e singolo parametro è stata effettuata la media denominata CON INTEGRAZIONE.

In seguito i dati per singolo soggetto e singolo parametro sono stati raggruppati per età (1-2 anni, 3-4 anni, 5-7 anni, 8-10 anni, è stato inoltre creato un ulteriore gruppo comprendente i soggetti 2-7 anni). I soggetti di questo gruppo rappresen-

tano, come riportato in bibliografia, l'intervallo di età nel quale le prestazioni dei riproduttori risultano ottimali¹⁴.

I dati raccolti nello studio sono rappresentati come valori medi (M) \pm deviazione standard (DS). La possibile influenza del fattore età e periodo di raccolta sui valori basali è stata verificata mediante correlazione di Pearson.

Si sono confrontate, mediante il Test T per campioni appaiati, le medie del PRE e CON INTEGRAZIONE per tutti i soggetti e per i GRUPPI di età. In seguito, utilizzando sempre il Test T per campioni appaiati, sono state confrontate le medie dei valori PRE INTEGRAZIONE con la media dei singoli prelievi CON INTEGRAZIONE (T₁-T₂-T₃) per tutti i soggetti, per i gruppi di età e per il gruppo 2-7 anni.

I dati sono stati analizzati utilizzando il software PASW (SPSS) vers. 19 e ponendo il valore di significatività per $p < 0,05$.

RISULTATI

Dall'analisi dei dati riferibili al BCS è emersa una variazione nella tonicità muscolare: infatti nel periodo PRE INTEGRAZIONE il 57,1% del campione (8/14 soggetti) corrispondente a soggetti impiegati in attività di lavoro (difesa, agility, ordine pubblico) presentavano valori 3 (tonicità moderatamente aumentata), al successivo controllo CON INTEGRAZIONE T₁ gli stessi soggetti presentavano già valori 4 (tonicità aumentata) che mantenevano fino alla fine dello studio, mentre il restante 42,9% (6/14 soggetti) che partiva da valori 2 (tonicità normale) PRE INTEGRAZIONE presentava al controllo CON INTEGRAZIONE T₁ il valore 3 e di questo, il 50% (3/6 soggetti) raggiungeva il valore 4 (tonicità aumentata) al controllo CON INTEGRAZIONE T₃.

Dall'analisi dei dati comportamentali a seguito dell'analisi dei questionari è emerso un aumento della marcatura del territorio: nel periodo PRE INTEGRAZIONE il 100% dei soggetti non presentava tale comportamento (valore 0), ai successivi controlli CON INTEGRAZIONE al 50% dei soggetti a T₁ veniva attribuito il valore (1), mentre al 78,5% dei soggetti corrispondente ad 11 soggetti su 14 a T₂ e T₃ il valore (2).

Per quanto concerne il manifestarsi di atteggiamenti di dominanza intraspecifica tra soggetti maschi nel periodo PRE INTEGRAZIONE, solo al 21,4% dei soggetti veniva attribuito il valore (1) mentre già nel controllo CON INTEGRAZIONE T₁ e successivamente anche a T₂ e T₃ al 64,2% dei soggetti veniva attribuito il valore (2).

Un altro aspetto comportamentale analizzato nel corso dello studio quale la reattività al lavoro è risultata aumentata; infatti nel periodo PRE INTEGRAZIONE al 57,1% del campione, corrispon-

dente a soggetti impiegati in attività di lavoro (difesa, agility, ordine pubblico), veniva assegnato il valore (1) e successivamente CON INTEGRAZIONE a T₁, - T₂ - T₃ il valore (2), mentre per tutti gli altri soggetti, corrispondenti al 42,9% del campione, da valore 0 PRE INTEGRAZIONE veniva attribuito il valore (1) già a partire dai controlli CON INTEGRAZIONE T₁.

I dati relativi alle manifestazioni riconducibili alla docilità indicano che nel periodo PRE INTEGRAZIONE il 14,2% dei soggetti manifestava già in partenza indocilità (-2) mantenuta per tutta la durata dello studio, mentre del restante 85,8% (12/14 soggetti) che manifestava valore (0) nel periodo PRE INTEGRAZIONE, il 33,3% (4/12 soggetti) presentava nel controllo CON INTEGRAZIONE T₁ valore (-1) e a T₂ e T₃ raggiungevano il valore (-2) il 66,6% dei soggetti (8 soggetti su 12). I valori medi (M) e i valori della deviazione standard (DS) relativi ai singoli parametri riferiti a tutti i soggetti nei diversi periodi di raccolta vengono riportati nella Tabella I.

Non è stata evidenziata nessuna differenza statisticamente significativa relativa all'influenza del fattore età e periodo di raccolta sui valori ottenuti.

Si possono evidenziare differenze significative tra i valori di tutti i soggetti PRE INTEGRAZIONE e CON INTEGRAZIONE riferiti al Volume dell'eiaculato ($p=0,035$) ed alla concentrazione di Tst ($p=0,030$), mentre per gli altri parametri (peso, pH, concentrazione, motilità, vitalità e concentrazione di fT₄) non si rilevano variazioni significative tra la media dei valori.

TABELLA I						
Media e Deviazione standard per ciascun parametro su tutti i soggetti coinvolti nello studio relative ai singoli prelievi						
	PRE INTEGR			POST INTEGR		
	T ₃ M \pm D.S.	T ₂ M \pm D.S.	T ₁ M \pm D.S.	T ₁ M \pm D.S.	T ₂ M \pm D.S.	T ₃ M \pm D.S.
Peso (kg)	27,21 $\pm 12,93$	27,44 $\pm 13,50$	27,46 $\pm 13,64$	27,68 $\pm 12,87$	27,25 $\pm 13,94$	28,80 $\pm 8,82$
Volume (ml)*	1,58 $\pm 1,70$	2,62 $\pm 2,50$	2,03 $\pm 2,02$	2,13 $\pm 2,14$	1,68 $\pm 1,55$	2,26 $\pm 2,14$
pH	6,35 $\pm 0,37$	6,17 $\pm 0,22$	6,37 $\pm 0,68$	6,42 $\pm 0,26$	6,28 $\pm 0,38$	6,55 $\pm 0,29$
Concentrazione (spz x 10 ⁶ / ml)	374,73 $\pm 550,99$	148,69 $\pm 154,99$	163,28 $\pm 192,63$	1389,76 $\pm 295,21$	1263,91 $\pm 162,23$	1380,82 $\pm 424,22$
Motilità (%)	30,51 $\pm 24,96$	55,27 $\pm 28,99$	54,04 $\pm 35,44$	55,82 $\pm 31,80$	29,51 $\pm 24,54$	34,63 $\pm 35,81$
Vitalità' (%)	65,35 $\pm 29,35$	73,36 $\pm 30,83$	63,00 $\pm 33,30$	87,20 $\pm 14,33$	70,27 $\pm 26,68$	83,43 $\pm 13,15$
Tst (ng/ml)*	1,03 $\pm 1,05$	1,16 $\pm 1,28$	3,60 $\pm 3,42$	3,64 $\pm 2,31$	3,25 $\pm 3,69$	3,64 $\pm 3,93$
fT ₄ (pg/ml)	1,94 $\pm 2,23$	2,35 $\pm 2,29$	6,12 $\pm 6,20$	6,24 $\pm 5,40$	5,58 $\pm 3,33$	6,41 $\pm 2,93$
* $p < 0,005$.						

L'aumento significativo della concentrazione di Tst indica un inequivocabile aumento dell'attività ormonale, con particolare riferimento alla sfera sessuale. Tale aumento di concentrazione del testosterone spiega gli effetti anabolizzanti e le variazioni comportamentali (aumento della tonicità muscolare, aumento della territorialità e della dominanza)⁹ registrate dai proprietari nel corso dello studio a seguito dell'integrazione alimentare. Nonostante l'assenza di una significatività, i valori medi riscontrati evidenziano un trend in aumento sui valori della Concentrazione spermatica e della Vitalità spermatica quindi un dato positivo come conseguenza dell'integrazione alimentare, mentre appare in diminuzione per il valore della Motilità spermatica. Tale andamento può essere conseguenza all'aumento della concentrazione e quindi una minor possibilità da parte degli spermatozoi di propagarsi nel mezzo. Tale dato deve essere quindi interpretato in relazione al singolo soggetto.

Si può inoltre evidenziare un aumento sul valore della concentrazione dell'fT₄. Tale andamento dell'attività tiroidea si correla ad un incremento del metabolismo e spiega le variazioni comportamentali (atteggiamento nevrotico)^{2,9,20} registrate dai proprietari nel corso dello studio a seguito dell'integrazione alimentare.

Importante per il mantenimento delle caratteristiche del materiale seminale risulta il dato relativo al pH, che rientra comunque nel range fisiologico per la specie canina⁹.

I valori relativi ai dati medi per ciascun parametro della categoria GRUPPI di età (1-2, 3-4, 5-7, 8-10 anni) vengono riportati nella Figura 1 con 2 successive serie di colonne (la prima serie indicante i valori PRE INTEGRAZIONE la seconda serie i valori CON INTEGRAZIONE).

Non si rilevano variazioni significative per nessun

parametro tra la media dei valori dei soggetti suddivisi per gruppi di età rispetto al PRE INTEGRAZIONE e CON INTEGRAZIONE. Nonostante l'assenza di significatività, si può osservare un trend in aumento per i valori riferiti al Volume dell'eiaculato nei soggetti dei gruppi 3-4 anni e 5-7 anni, del pH nei soggetti dei gruppi 1-2 anni, 3-4 anni e 8-10 anni, della Concentrazione spermatica per i gruppi 1-2 anni, 3-4 anni e 5-7 anni, della Vitalità spermatica nei soggetti dei gruppi 3-4 anni e 5-7 anni e della concentrazione dell'fT₄ nei gruppi 3-4 anni, 5-7 anni, 8-10 anni.

Si può, inoltre, evidenziare un trend in aumento sul valore della concentrazione del Tst in tutti i gruppi di età rispecchiando perfettamente il dato significativo evidenziato in precedenza su tutti i soggetti.

Dai dati ottenuti si evidenzia come la risposta maggiore si presenti nei gruppi che rappresentano i soggetti nell'età più attiva della carriera riproduttiva dando un'indicazione positiva all'impiego di tale dieta.

I valori relativi ai singoli parametri vengono di seguito riportati nella Figura 2 corrispondente ai dati medi riferiti al confronto valore medio complessivo PRE INTEGRAZIONE (T_{-3} , T_{-2} , T_{-1}) vs T_1 , T_2 , T_3 considerando TUTTI i soggetti. Il valore medio complessivo PRE INTEGRAZIONE (T_{basale}) è stato calcolato previa verifica della non influenza del fattore tempo.

È possibile evidenziare la presenza di variazioni significative tra la media dei valori relativi a tutti i soggetti riferiti alle singole correlazioni T_{basale} e T_1 ($p=0,0001$) - T_2 ($p=0,0001$) - T_3 ($p=0,0001$) per il valore del Peso corporeo, per le correlazioni T_{basale} e T_1 ($p=0,016$) - T_2 ($p=0,010$) per il valore del volume dell'Eiaculato e per quelle T_{basale} - T_2 ($p=0,001$) e T_3 ($p=0,039$) per il valore della Concentrazione spermatica.

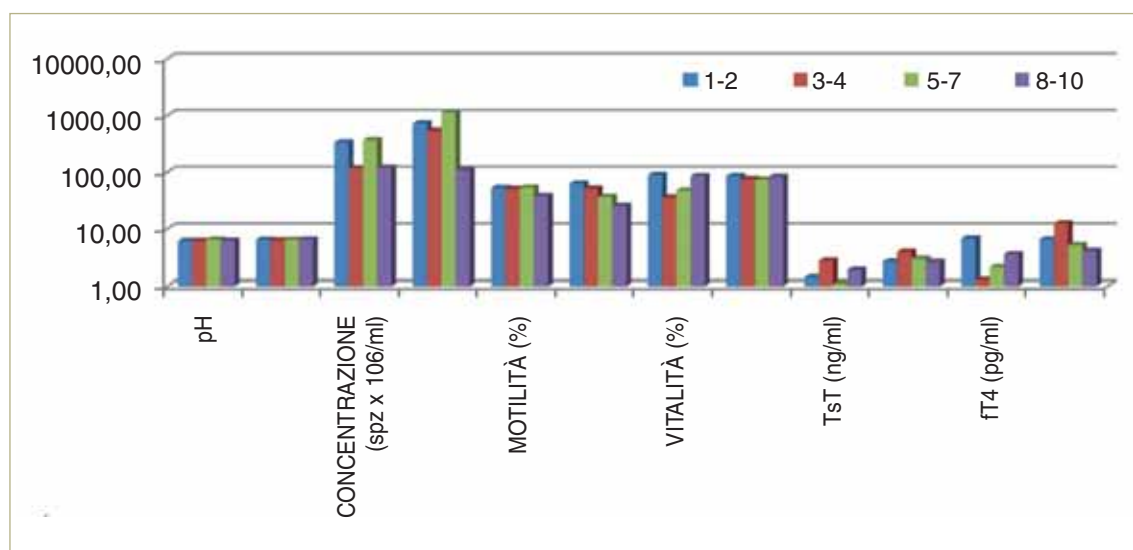


FIGURA 1 - Confronto dei dati medi dei singoli parametri relativi alla categoria GRUPPI DI ETÀ 1-2, 3-4, 5-7, 8-10 anni.

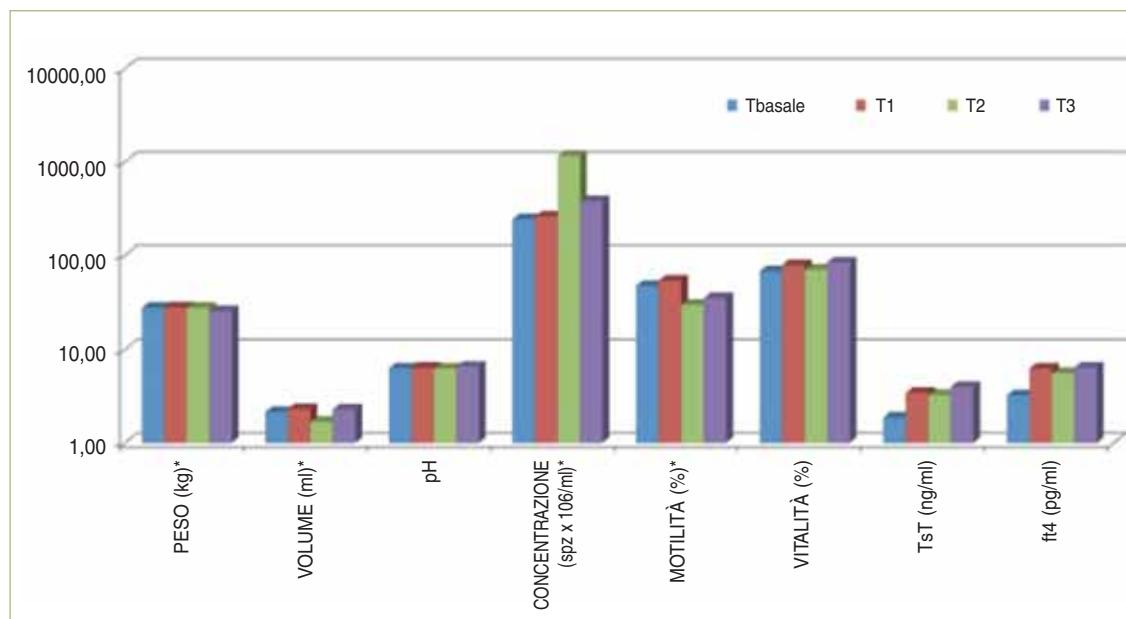


FIGURA 2 - Valori relativi ai singoli parametri dei dati medi riferiti alla correlazione T_{basale} e $T_1 - T_2 - T_3$ considerando TUTTI i soggetti.

* $p < 0,005$.

Peso* T_{basale} vs $T_1 - T_2 - T_3$ - Volume* T_{basale} vs $T_1 - T_2$ - Concentrazione* T_{basale} vs $T_2 - T_3$ - Motilità* T_{basale} vs T_1 - Testosterone* T_{basale} vs T_2

Riferito a tale parametro risulta molto evidente un incremento del valore in corrispondenza del prelievo T_2 .

Si rilevano variazioni significative tra la media dei valori relativi a tutti i soggetti riferiti alle singole correlazioni T_{basale} e T_1 ($p=0,048$) per il valore della Motilità spermatica e per le singole correlazioni T_{basale} e T_2 della concentrazione del Testosterone ($p=0,049$). Non si rilevano invece, variazioni significative tra la media dei valori relativi a tutti i soggetti riferiti al confronto T_{basale} e $T_1, - T_2 - T_3$ per il valore del pH, per il valore della Vitalità spermatica e per quello della concentrazione del fT_4 .

I valori medi (M) e i valori della deviazione standard (DS) relativi ai singoli parametri riferiti al GRUPPO 2-7 anni vengono riportati nella Tabella 2 indicante con T_{basale} la media dei valori ($T_{-3}, - T_{-2} - T_{-1}$) e con T_{integr} la media dei valori T_1, T_2, T_3 .

Si evidenzia una differenza significativa tra la media dei valori T_{basale} e T_{integr} riferiti ai parametri: Volume ($p=0,004$), Motilità spermatica ($p=0,024$) concentrazione di Tst ($p=0,014$) con incremento del valore T_{integr} indice da valutare positivamente sul piano della qualità del materiale seminale.

Non si rilevano variazioni significative tra la media dei valori relativi al gruppo 2-7 anni riferiti al confronto T_{basale} e T_{integr} per i valori del Peso corporeo, del pH, della Vitalità spermatica e della concentrazione dell' fT_4 .

I valori relativi ai singoli parametri vengono di seguito riportati nella Figura 3 corrispondente ai dati medi riferiti al confronto T_{basale} vs $T_1, - T_2 - T_3$ considerando i soggetti del gruppo 2-7 anni.

Si rilevano variazioni lievemente significative tra la media dei valori relativi al gruppo 2-7 anni riferiti unicamente al confronto T_{basale} e T_3 per il valore del Volume totale dell'eiaculato e per il valore della Vitalità spermatica.

Non si rilevano variazioni significative tra la media dei valori relativi al gruppo 2-7 anni riferiti al confronto T_{basale} vs $T_1, - T_2 - T_3$ per i valori del Peso

TABELLA 2
Media e Deviazione standard per ciascun parametro sui soggetti appartenenti al gruppo 2-7 anni

		Media	D.S.
PESO (kg)	T_{basale}	23,57	8,74
	T_{integr}	24,04	8,68
VOLUME (ml)*	T_{basale}	1,67	1,07
	T_{integr}	2,37	1,74
pH	T_{basale}	6,31	0,51
	T_{integr}	6,42	0,20
Concentrazione (spz x $10^6/ml$)	T_{basale}	298,20	269,28
	T_{integr}	810,50	1229,95
Motilità (%)*	T_{basale}	46,54	10,60
	T_{integr}	54,73	23,72
Vitalità (%)	T_{basale}	53,95	25,80
	T_{integr}	76,08	10,67
Tst (ng/ml)*	T_{basale}	1,81	1,60
	T_{integr}	3,48	2,00
fT_4 (pg/ml)	T_{basale}	3,63	3,36
	T_{integr}	7,03	4,12

* $p < 0,005$.

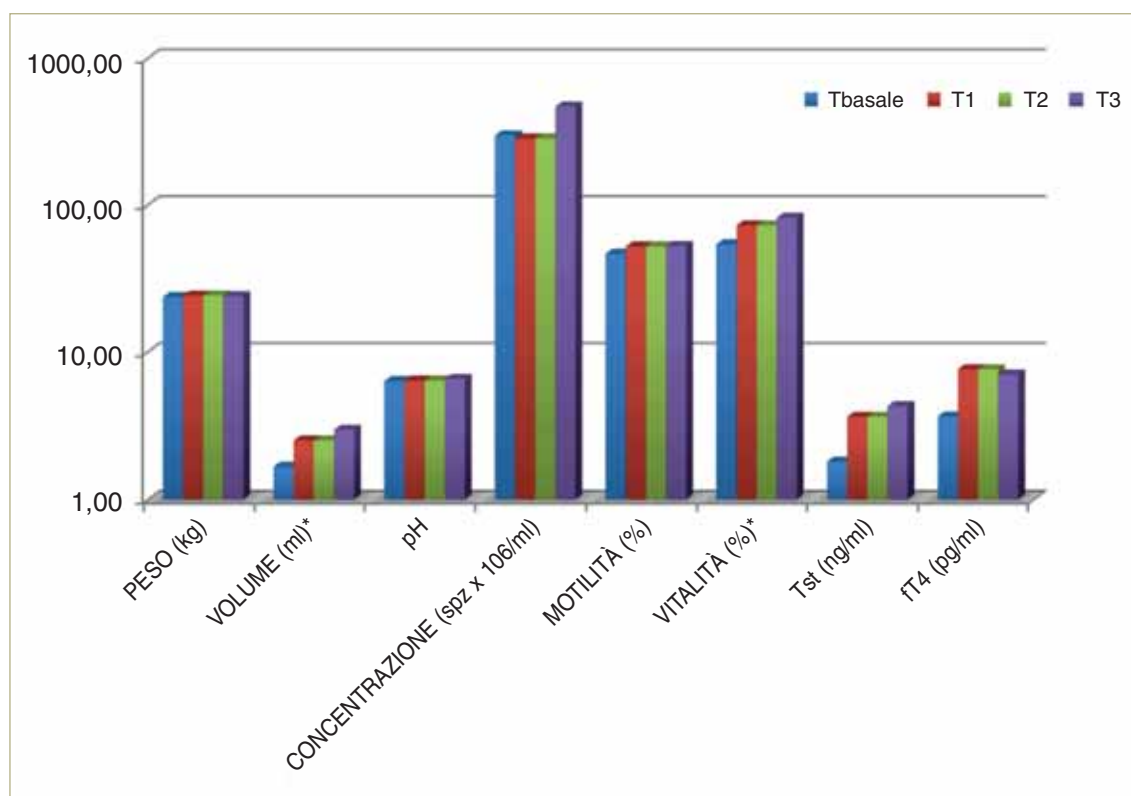


FIGURA 3 - Valori relativi ai singoli parametri 2 dei dati medi riferiti alla correlazione T_{basale} e $T_1 - T_2 - T_3$ considerando la categoria gruppo 2-7 anni.

* $p < 0,005$. Volume* T_{basale} vs T_3 - Vitalità* T_{basale} vs T_3

corporeo, del pH, della Concentrazione spermatica, della Motilità spermatica, della concentrazione del Tst e della concentrazione dell'fT₄.

DISCUSSIONI

L'assunzione di antiossidanti è fondamentale per il mantenimento della normale funzione riproduttiva, Selenio e Zinco sono oligoelementi che devono essere normalmente forniti dalla dieta, mentre la vitamina E è una potente molecola antiossidante che non può essere sintetizzata dalle cellule di mammiferi^{1,5,11}.

I risultati riportati in questo studio, alla luce della mancata influenza del fattore età e periodo di raccolta (tempo), dimostrano che l'integrazione alimentare specifica di sostanze fitoterapiche ha portato ad una veloce risposta organica, già nei primi 45 gg di integrazione (T₁) e un costante aumento dell'attività metabolica (fT₄) da considerarsi positiva per l'influenza che l'attività tiroidea esercita sulla sfera riproduttiva. Non si sono invece osservate modificazioni significative nel peso corporeo pur rilevandosi un aumento della massa e della tonicità muscolare durante l'esame obiettivo generale e la valutazione del BCS imputabile all'aumento costante dell'attività endocrina (Tst). All'influenza ormonale androgena è imputabile la modificazione costante del comportamento, se-

gnalata dai singoli proprietari, caratterizzata da marcata dominanza territoriale e sociale in tutti i gruppi di soggetti presi in esame.

Per quanto riguarda le caratteristiche del seme, dai dati ottenuti si evince che l'integrazione specifica della dieta induce la variazione di alcuni parametri seminali (volume, pH), mantenendoli comunque nel range fisiologico⁹, per cui non si hanno significative influenze sulla qualità del seme, mentre si osservano significative risposte per i parametri relativi nella valutazione quali-quantitativa del seme (concentrazione, motilità, vitalità) nel gruppo di soggetti 2-7 anni. Risultati simili sono stati osservati in cani nei quali l'integrazione con vitamina E aumenta la motilità del materiale seminale¹⁶. Studi nell'uomo hanno evidenziato un significativo miglioramento nella qualità del seme dopo l'uso di Vitamina E come anti-ossidante²⁵ a conferma che un aumento della perossidazione lipidica influenza positivamente la motilità.

Le variazioni significative osservate nel gruppo di soggetti 2-7 anni sembrano indicare la sensibilità manifestata in un momento particolare della carriera riproduttiva caratterizzato dalle massime performance. Questa fascia di età può rappresentare il gruppo di riferimento e obiettivo principale come target di impiego di questa dieta mirata. L'integrazione dietetica però non sembra influenzare in senso positivo i valori dei parametri quali-quantitativi del seme nei soggetti anziani nei quali fisio-

logicamente l'invecchiamento dei tessuti e la minore attività metabolica sono tali per cui l'integrazione non è in grado di indurre variazioni significative. La somministrazione di tale dieta si rivela utile e consigliabile in contesti di allevamento per il raggiungimento di un miglioramento di performance riproduttive sia in situazioni di monta naturale che assistita.

Auspiciati miglioramenti si possono ottenere con l'impiego della dieta soprattutto per tempi limitati (2 mesi circa) grazie alla risposta repentina evidenziata dai dati ottenuti.

Un impiego per tempi prolungati (maggiore di 4 mesi T_3) comporta una situazione di buona stabilizzazione delle performance ma potrebbe implicare la necessità di un attento monitoraggio comportamentale.

Tale dieta mirata è consigliata in soggetti riproduttori in allevamento nel massimo della loro carriera (2-7 anni) per aumentarne ulteriormente le performance in periodi di maggiore impiego.

Tale integrazione non sembra particolarmente indicata per il miglioramento delle performance nei soggetti anziani, pur non escludendone un impiego mirato in soggetti di alta genealogia nel tentativo di raccogliere e conservare nel tempo alcune aliquote di materiale seminale utilizzabili ai fini riproduttivi.

Gli incoraggianti risultati ne indicano un impiego soprattutto in allevamento in condizioni controllate, al fine di ottimizzare al massimo tempi, gestione e benefici in ambito nutrizionale e riproduttivo.

Parole chiave

Riproduzione, alimentazione integrata, materiale seminale, attività endocrina, cane riproduttore.

■ Influence of a dietary supplementation on the semen quality and endocrine functionality in the dog breeding

Summary

The importance of antioxidants in a diet on reproduction in animals is widely documented. The aim of this research was to evaluate the effects supplements with phytotherapeutics, vitamins and oligoelements may have on reproduction in 14 fertile male dogs divided into four age groups. Research lasted eight months, divided into two phases of 3 and 4½ months (PRE SUPPLEMENTATION - use of previous diet - WITH SUPPLEMENTATION - supplemented diet), whereas as day 0 (T_0) on the day of beginning of the dietary supplementation. During each phase, biological material was collected 3 times, every 45 days (T_{-3} , T_{-2} , T_{-1} - T_1 , T_2 , T_3): (I) quantitative evaluation (blood sample) for endocrine, Tst (ng/ml), fT_4 (pg/ml); (II) quantity-quality evaluation of semen; (III) general examination; (IV) follow-up with owners (potential changes in behaviour).

Data shows a rapid response to the new diet: constant increase in metabolic activity (fT_4 , Tst) within 45 days, which has a positive influence on thyroid activity and reproduction; no significant changes in body weight, increased muscle tone, data on behaviour showed an increase in territoriality (80%) and dominance (60%) due to the testosterone present. There are positive, significant differences in semen concentration, motility and vitality within the 2-7 year group. The diet was created especially for this age group because this group reaches a peak in performance. Supplementation does not seem to positively influence the semen values in mature subjects: nor does supplementation significantly alter ageing in tissues or metabolism. Considering this encouraging outcome, the diet should be used for breeding, to maximize reproduction management.

Key words

Reproduction, dietary supplementation, semen, endocrine activity, dog breeding.

BIBLIOGRAFIA

1. Almeida J, Ball BA. Effect of tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 87:321-337, 2005.
2. Ajitkumar G, Sreekumaran T, Praseeda R, Mercy KA, Ghosh KN. Comparative efficacy of bromocriptine, cabergoline and thyroxine in inducing oestrus in bitches. *Veterinary Research Communications* 34(1):65-9, 2010.
3. Apgar J. Zinc and reproduction. *Annual Review of Nutrition*, 5:43- 68, 1985.
4. Bobic Gavrilovic B, Andersson K, Linde Forsberg C. Reproductive patterns in the domestic dog - A retrospective study of the Drever breed *Theriogenology* 70:783-794, 2008.
5. Contri A, De Amicis I, Molinari et al. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology* 75:1319-1326, 2011.
6. Christiansen IJ, 1984 Reproduction in the dog and cat. Bailliere Tindal, United Kingdom.
7. Deichsel K, Palm F, Koblichke P et al. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology* 69:940-945, 2008.
8. Dix CJ, Habberfield AD, Sullivan MF, Cooke BA. Inhibition of steroid production in Leydig cells by non-steroidal anti-inflammatory and related compounds: evidence for the involvement of lipoxigenase products in steroidogenesis. *Biochemical Journal* 219, 529-537, 1984.

9. Feldman EC, Nelson RW. Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Philadelphia: WB Saunders Co, 2004.
10. Foote RH, Swierstra EE, Hunt WL. Spermatogenesis in the dog. *Anatomical Record*. 173(3):341-51, 1972.
11. Hardy G, Hardy I, Manzanares W. Selenium supplementation in the critically ill. *Nutrition in Clinical Practice* 27(1):21-33, 2012.
12. Iguer-Ouada M, Verstegen JP. Evaluation of the "Hamilton Thorn Computer Based Automated System" for dog semen analysis. *Theriogenology* 55:733-749, 2001.
13. James LF, Panter KE, Nielsen DB, Molyneux RJ. The effect of natural toxins on reproduction in livestock. *Journal of Animal Science* 70(5):1573-1579, 1992.
14. Kubinyi E, Turcsán B, Miklósi A. Dog and owner demographic characteristics and dog personality trait associations. *Behavioural Processes* 81: 392-401, 2009.
15. Laflamme D. Development and validation of a Body Condition Score System for dog canine. *Practice* 22(4):10-15, 1997.
16. Leite Neto MC, Goes PAA, Rodrigues MP, et al. Effects of vitamin E and brewer's yeast on sperm quality in dogs. *Brazilian Congress Animal Reproduction* 17: 171, 2007.
17. Mawby DI, Bartges J, d'Avignon A, Laflamme D, Moyers TD, Cottrell T. Comparison of various methods for estimating Body Fat in Dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*; 40:109-114, 2004.
18. Marin-Guzman J, Mahan DC, Chung YK, et al. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilt. *Journal of Animal Science* 75:2994 -3003, 1997.
19. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 112:119-135, 2009.
20. Panciera DL, Purswell BJ, Kolster KA, Were SR, Trout SW. Reproductive Effects of Prolonged Experimentally Induced Hypothyroidism in Bitches. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26 (2):326-333, 2012.
21. Panter KE, Stegelmeier BL. Effects of Xenobiotics and Phytotoxins on Reproduction in Food Animals. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 27 (2):429-446, 2011.
22. Pinto CRF. Simplified hypoosmotic swelling testing of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 104:450-455, 2008.
23. Ponglowhapan S, Essén-Gustavsson B, Linde Forsberg C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. *Theriogenology*. 62(8):1498-517, 2004.
24. Rocha AA, da Cunha IC, Ederli BB, et al. Effect of daily food supplementation with essential fatty acids on canine semen quality. *Reproduction in Domestic Animal*. 44 (2):313-315, 2009.
25. Suleiman SA, Ali ME, Zaiu ZMS, et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of Andrology* 17:530-537, 1996.
26. Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer Assisted semen Analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179, 2002.
27. Wong WY, Thomas CM, Merkus JM, et al. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. *Fertility and Sterility* 73:435- 442, 2000.
28. Ziegler EE, Filer LJ. Present knowledge in nutrition. ILSI Press, International Life, Washington, USA, 1996.