

Ocratossina A e tossicità nell'equino: valutazione dell'esposizione, del passaggio placentare e della tossicità su parametri funzionali spermatici dopo esposizione *in vitro* valutata tramite metodologie innovative e computerizzate

F. Minervini¹, R. Guastamacchia², G.M. Lacalandra³, G. Panzarini¹, M.E. Dell'Aquila²

¹Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari (ISPA), CNR, Bari

²Dipartimento di Bioscienze, Biotecnologie e Biofarmaceutica (DBBB), Università degli studi di Bari Aldo Moro, Bari

³Sezione di Cliniche Veterinarie e Produzioni Animali, Dipartimento dell'Emergenza e Trapianti d'Organo (DETO), Università degli Studi di Bari Aldo Moro, Bari

L'ocratossina A (OTA) è una nefrotossina prodotta da funghi del genere *Aspergillus* e *Penicillium* con nota attività cancerogena, genotossica e teratogena. Riduzione della funzionalità riproduttiva è stata riportata nel suino (Birò et al 2003), ma non ci sono informazioni sui livelli di esposizione e sulla tossicità riproduttiva nell'equino. Scopo del lavoro è stato di valutare l'esposizione naturale degli equini all'OTA e il passaggio placentare, quantificando OTA nel siero raccolto da stalloni, cavalle cicliche e gravide e dal cordone ombelicale di puledri alla nascita. Inoltre, dopo esposizione *in vitro* di spermatozoi equini a livelli di OTA compresi tra 750 nM a 24 µM, si è valutata la vitalità (con il SYBR14/ioduro di propidio), la stabilità cromatinica utilizzando il test SCSA (con l'arancio di acridina), la produzione di ROS (utilizzando il 2',7'-diclorofluorescein-diacetato) tramite analisi citofluorimetriche e la motilità spermatica tramite il sistema CASA (Giannoccaro et al 2010; Minervini et al 2010). Sono stati esaminati campioni di seme prelevati nella stagione riproduttiva (Aprile-Luglio) e non riproduttiva (Novembre-Gennaio). Le analisi citofluorimetriche sono state condotte dopo 2 ore (vitalità e SCSA) e dopo 30 min (ROS) di esposizione all'OTA. La motilità è stata analizzata dopo 30 min. L'OTA è stata ritrovata nell'83% dei campioni di siero di stalloni (valore mediano=121.4 pg/ml). In 14 campioni di siero su 17 raccolti da cavalle gravide, l'OTA è stata riscontrata con un livello simile (livello mediano=106.6 pg/ml), mentre è stata riscontrata solo nel 50% dei campioni serici prelevati dal cordone ombelicale, con un livello mediano pari a 96.6 pg/ml. La tossicità dell'OTA, dopo esposizione *in vitro*, è stata ritrovata solo in spermatozoi raccolti durante la stagione non riproduttiva. In entrambe le stagioni esaminate, la vitalità spermatica e la stabilità cromatinica non sono state influenzate da tutte le concentrazioni testate. Al contrario l'OTA ha indotto un significativo effetto pro-ossidante (evidenziato come aumento dei livelli di ROS) dopo esposizione *in vitro* a concentrazioni da 12 a 24 µM. Inoltre, un significativo aumento della motilità totale è stato registrato dopo esposizione per 30 minuti alle stesse concentrazioni. Gli equini sono risultati esposti a bassi livelli di OTA la cui presenza potrebbe rappresentare un rischio per l'efficienza riproduttiva di tale specie, dovuto ad un possibile accumulo nel plasma seminale e tossicità sui parametri spermatici, come riscontrato anche nel suino (Birò et al 2003). L'esposizione *in vitro* per brevi tempi all'OTA ha determinato un aumento dei livelli di ROS e di motilità solo negli spermatozoi equini raccolti nella stagione non riproduttiva. Questa maggiore sensibilità degli spermatozoi prelevati nella stagione non riproduttiva potrebbe essere dovuta a modificazioni morfologiche e funzionali presenti nelle due stagioni del cavallo conseguenti a fluttuazioni ormonali stagionali (Blottner et al, 2000; Hoffman and Landeck 1999). La tossicità sugli spermatozoi (cellula differenziata molto resistente agli stimoli tossici) è stata riscontrata a concentrazioni più elevate di quelle presenti nel siero. In conclusione l'equino risulta esposto naturalmente all'OTA. La presenza della micotossina nel cordone ombelicale e l'effetto tossico ritrovato negli spermatozoi prelevati nella stagione non riproduttiva consentono di ipotizzare una tossicità nel feto e nello stallone in condizioni di esposizione naturale.

Birò et al. 2003. *Theriogenology* 60:199-2007. Giannoccaro et al. *Journal of Cell and Animal Biology* Vol. 4(2), pp. 034-041; Minervini. 2010. *Toxicology in vitro* 24 :2072-2078; Blottner et al 2000. *Anim. Reprod. Sci* 65:75-88; Hoffmann and Landeck. 1999. *Anim Reprod. Sci* 57:89-98.