



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

P.O.R. ABRUZZO – OBIETTIVO 3 PER IL 2000/2006
PROTOCOLLO DI INTESA TRA REGIONE ABRUZZO,
COMITATO DI COORDINAMENTO REGIONALE DELLE UNIVERSITA' ABRUZZESI
E
UFFICIO SCOLASTICO REGIONALE
PER L'ATTUAZIONE DEL MACROPROGETTO
INNOVAZIONE, COMPETITIVITÀ, GOVERNANCE
(PROGETTO REGIONALE FORMAZIONE TECNICO SCIENTIFICA
E
PROGETTO IN_CO: AZIONI INTEGRATE PER LO SVILUPPO DI
“INTERMEDIARI DELLA CONOSCENZA TECNOLOGICA, ORGANIZZATIVA E GESTIONALE”)
“ASSEGNI REGIONALI PER ATTIVITÀ DI RICERCA E ALTA FORMAZIONE “ IN MATERIE TECNICO
SCIENTIFICHE, INTERVENTO IC4E – sotto - UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO-

Relazione Attività periodo Aprile - Giugno 2007

ASSEGNISTA DI RICERCA:

Falasca Giulio

Tutor/ Responsabile Scientifico:

Prof.ssa Barbara Barboni

Nome istituzione a cui affersce laboratorio ospitante:

SEMENTALY (Modena).

Nome e qualifica del responsabile del laboratorio ospitante:

Dott. SERGIO TASCHINI

Durata soggiorno laboratorio ospitante:

3 trimestri

ELABORAZIONE DI METODICHE VOLTE A VALUTARE I DANNI DA CONGELAMENTO NEL SEME SUINO

RELAZIONE I TRIMESTRE

PREMESSA

La disponibilità di dosi di seme congelato rappresenta la condizione fondamentale per poter massimizzare i vantaggi derivanti dell'applicazione delle tecniche d'inseminazione strumentale. Il seme congelato consente, infatti, una più oculata programmazione dell'uso del materiale genetico e una maggiore sicurezza sul profilo sanitario, svincolandolo da limitazioni d'ordine spazio-temporale. Tuttavia, mentre in alcune specie animali, come nella bovina, sono disponibili tecnologie tali da rendere possibile una larghissima diffusione della crioconservazione del seme, tali metodiche non sono ancora state trasferite con altrettanta efficienza nel mondo della riproduzione suina.

In questa specie, che assume una rilevanza di primo piano per quanto riguarda la produzione di alimenti d'origine animale, infatti il congelamento del seme non ha avuto una diffusione adeguata in quanto, nonostante i numerosi tentativi, non è a tutt'oggi disponibile una tecnologia di congelamento rispondente alle esigenze dell'allevamento industriale e per questo la stragrande maggioranza delle fecondazioni artificiali viene effettuata con seme refrigerato a 16°C. Verosimilmente la principale causa, risiede nella particolare composizione lipidica delle membrane cellulari degli spermatozoi di maiale che gli rende estremamente sensibili all'esposizione alle basse temperature. Infatti, già scendendo a valori prossimi a 0°C si evidenziano notevoli modificazioni morfo-fisiologiche che danneggiano la funzionalità della cellula. Anche l'impiego di crioprotettori non ha ancora consentito di ottenere protocolli di congelamento sufficientemente efficienti. Sembra inoltre acclarato che fattori soggettivi, legati al singolo verro, giochino un ruolo fondamentale nel determinare l'idoneità del seme al congelamento. Infine un altro problema è costituito dal fatto che, dato l'alto numero di spermatozoi e l'elevato volume necessario per ciascuna fecondazione, è necessario fruire di protocolli molto complessi e laboriosi che prevedono la suddivisione dell'eiaculato in molte sotto-frazioni, previo l'allontanamento del plasma seminale, ed il congelamento separato per ogni aliquota. Ovviamente, anche lo scongelamento e la fecondazione risentono dello stesso problema richiedendo la riunificazione delle varie frazioni e la loro diluizione in un extender opportunamente formulato a tale scopo. Pertanto l'uso routinario dell'inseminazione strumentale con seme suino congelato appare ancora di limitata applicabilità, proprio nel momento in cui nuove istanze la renderebbero la tecnica d'elezione. Tra queste, ad esempio l'abbinamento ad altre forme di biotecnologie (Sperm Mediated Gene Transfer, fecondazione con spermatozoi sessati, ...) o l'espletamento d'analisi lunghe e rigorose volte a liberalizzare l'uso delle dosi solo dopo aver

escluso la presenza di patogeni infettivi o contaminanti vari, mentre la possibilità di conservare del materiale seminale per lunghi periodi permetterebbe di migliorare la genetica dei riproduttori mediante test di progenie.

MATERIALI E METODI

Il seme utilizzato è stato raccolto settimanalmente da 12 verri di provata fertilità d'età compresa da 1 a 5 anni appartenenti a diverse razze e stabulati presso l'azienda Semenitaly Modena. Il prelievo è stato eseguito con la tecnica della mano guantata dopo aver deterso il prepuzio con uno spray igienizzante non spermicida e usando guanti monouso non spermotossici senza talco. Dopo aver eliminato la prima parte dell'eiaculato e aver filtrato con garze sterili la parte intermedia, il seme è stato raccolto in flask e subito portato in laboratorio in un contenitore isotermico. Qui è stato congelato secondo un protocollo validato normalmente impiegato dalla Semenitaly e perciò coperto da Copyright. Successivamente le paillettes estratte dal contenitore di stoccaggio contenente azoto liquido sono state immerse per 20 secondi nel acqua contenuta in un bagnetto termostato (GTR2000 llx; Steroglass) a diverse temperature (42°C, 38°C, 34°C, 30°C) a seconda delle necessità sperimentali. Il loro contenuto è stato trasferito in una provetta con 5ml di Dulbecco + Bovine serum albumin (0,4%) preriscaldato a 38,5 °C, che successivamente è stato sigillato in maniera da impedire scambi gassosi con l'ambiente esterno e mantenuto ad una temperatura costante di 38,5 °C. Le prove sono state condotte sul seme immediatamente dopo lo scongelamento (T0) e dopo 45 minuti (T45) d'incubazione allo scopo di verificare se il tempo d'osservazione, rispetto a quello di scongelamento, poteva influire sulla percentuale di spermatozoi con acrosoma integro. Con sistema digitale SQA (Sperm Quality Analyzer), quindi, è stata valutata su ciascun'aliquota, la motilità cellulare. In seguito, solo dai campioni che presentavano tale parametro nella norma, sono stati prelevati 100 µl di campione e sono stati dapprima centrifugati a 400 g per 5 minuti ed in seguito risospesi in etanolo e stoccati a -20°C per la successiva valutazione dell'integrità acrosomiale.

Per questo scopo è stata utilizzata una lectina FITC coniugata (PSA-FITC, Pisum sativum agglutinin, Sigma) che dopo permeabilizzazione della membrana, è in grado di legarsi selettivamente al contenuto della vescicola acrosomiale. Quest'ultima, se ancora presente, emette quando osservata al microscopio a fluorescenza, un'intensa colorazione verde, che manca negli spermatozoi "reatti", ovvero che hanno perso, anche solo parzialmente, tale struttura. Gli spermatozoi sono stati quindi osservati con un microscopio Nikon Eclipse E600 dotato di un filtro apposito (EX 465-495; DM 505; BA 515-555) a 400 ingrandimenti usando un obiettivo Plan Fluor

con contrasto di fase. Per ogni campione sono state effettuate due letture di almeno 200 cellule ciascuna.

RISULTATI

I dati che seguono rappresentano la media di tre esperimenti indipendenti; i tests di confronto (ANOVA one way) e di correlazione sono stati realizzati mediante Microcal Origin 6.0. Sono state ritenute significative differenze per $p < 0.05$ e altamente significative per $p < 0.01$.

Grazie ai risultati ottenuti è stato possibile dimostrare che la temperatura di scongelamento (42°C , 38°C , 34°C , 30°C) ha un effetto statisticamente evidenziabile sulla percentuale di spermatozoi con acrosoma integro ($n = 12$; $p = 0.00328$) e che le due grandezze sono tra loro strettamente correlate (% acrosomi integri a $42^{\circ}\text{C} = 93.9$, a $38^{\circ}\text{C} = 79.4$, a $34^{\circ}\text{C} = 79.8$, a $30^{\circ}\text{C} = 71.8$; $r = 0.912$). Inoltre è stato evidenziato come con l'abbassamento della temperatura di scongelamento aumenti la variabilità interna al campione dei verri (d.s. a $42^{\circ}\text{C} = 4.1$, a $38^{\circ}\text{C} = 8.9$, a $34^{\circ}\text{C} = 9.1$, a $30^{\circ}\text{C} = 12.0$), con conseguente incremento del dato differenziale tra i risultati in funzione della temperatura.

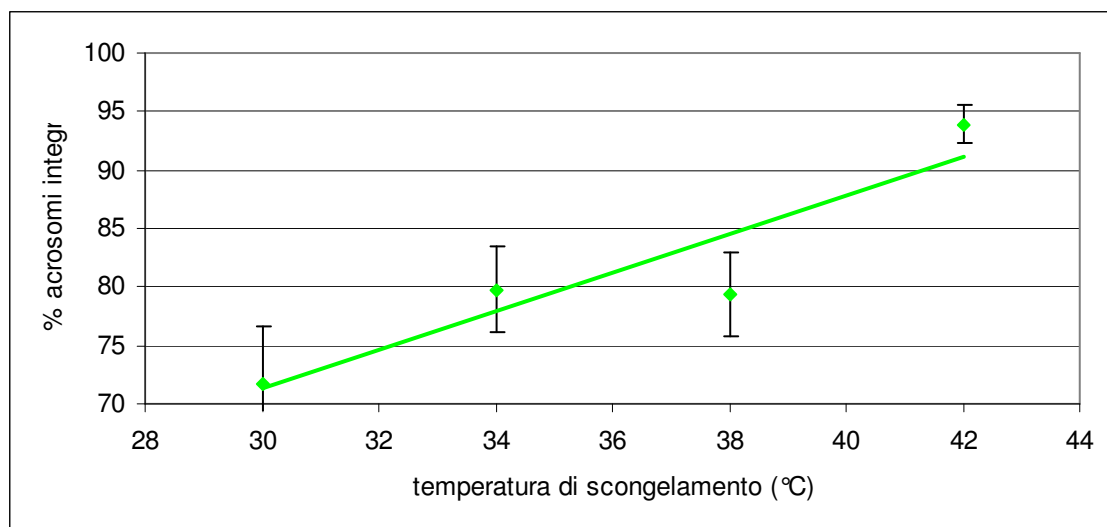


Grafico 1

Rappresentazione grafica della percentuale d'acrosomi integri in funzione della temperatura di scongelamento.

Il confronto tra i dati ottenuti scongelando a 42°C e 30°C il seme dei verri esaminati ha consentito di verificare come soggetti con una buona performance a 42°C mantengono un'alta percentuale d'acrosomi integri anche dopo scongelamento a 30°C , quindi, viceversa, la performance di riproduttori meno resistenti peggiora notevolmente dopo scongelamento a 30°C .

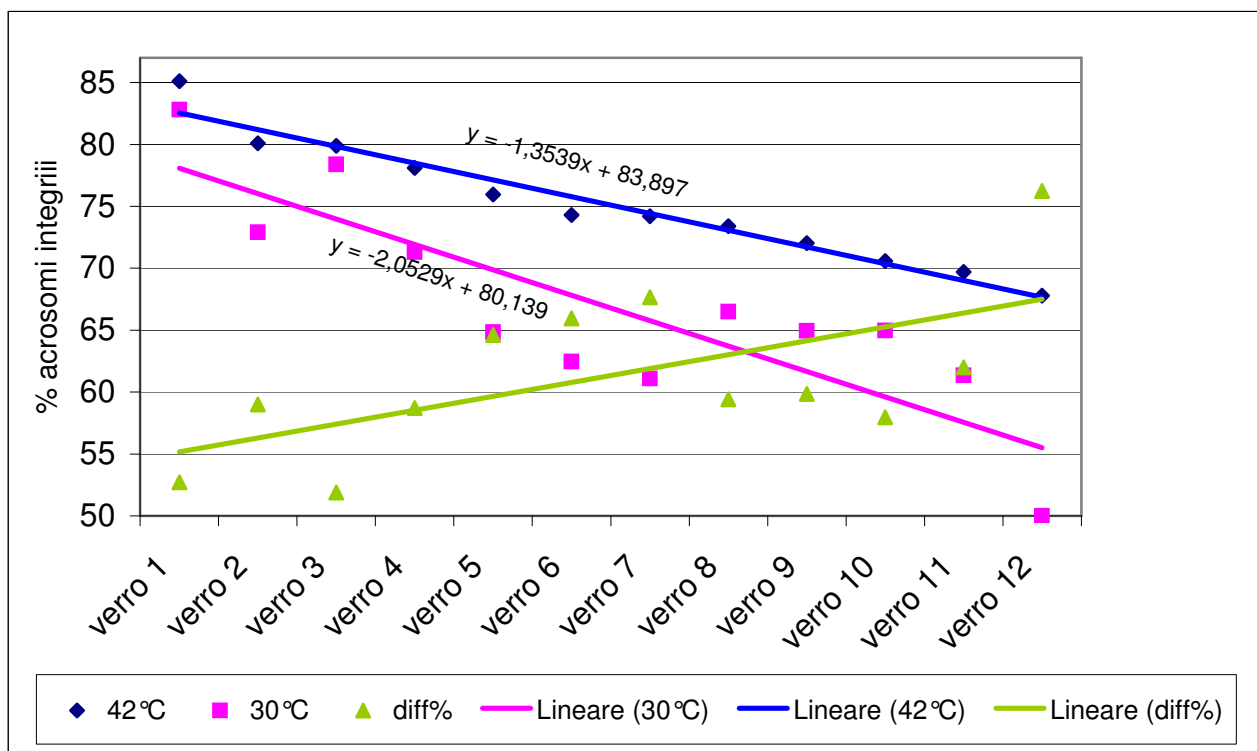


Grafico 2

Rappresentazione grafica della performance assoluta e differenziale di campioni di seme scongelati a 42°C e a 30°C.

Inoltre, al decrescere del valore di spermatozoi integri a 42°C, quello ottenuto a 30°C diminuisce maggiormente, come testimoniato dai coefficienti angolari delle rette di regressione ottenute nelle due diverse condizioni, rispettivamente pari a -1.3539 e -2.0529 . In più il dato differenziale, espresso come differenza percentuale d'acrosomi integri a 42°C – acrosomi integri a 30°C, aumenta col peggiorare della performance ed è strettamente correlato al risultato ottenuto a 30°C ($r = -0.917$).

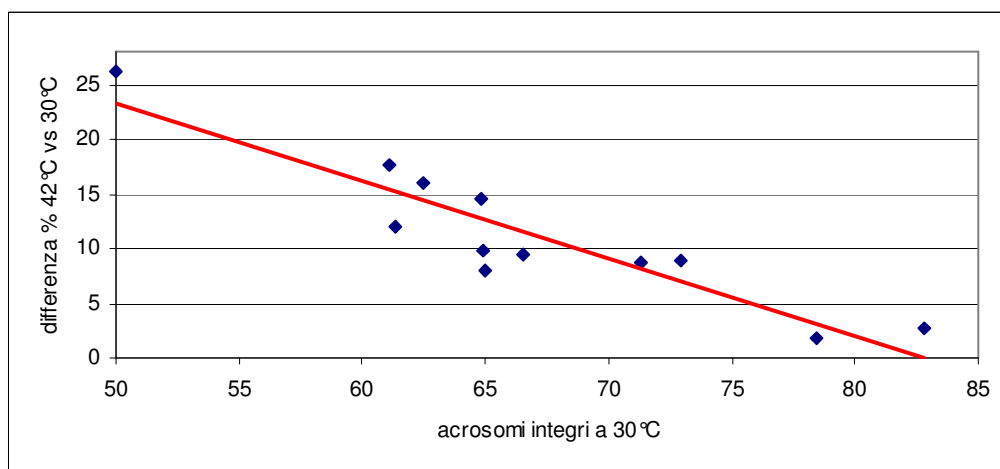


Grafico 3

Rappresentazione grafica della correlazione tra la percentuale degli acrosomi integri a 30°C e la prestazione differenziale tra la temperatura ottimale e quella subottimale.

Infine, è stato dimostrato che il tempo d'incubazione a 38.5°C in Dulbecco + BSA(0.4%) dopo lo scongelamento, influisce sulla percentuale di spermatozoi con acrosoma intatto: 74.7±1.2% al tempo 0, 70.5±3.0% dopo 45 min. (n = 12; p = 0.00969).

DISCUSSIONE

E' stato pertanto proposto di affiancare al riscontro della motilità anche quello della percentuale d'acrosomi integri dopo scongelamento a temperature subottimali (30°C) ed osservazione del campione dopo 45 minuti d'incubazione a 38.5°C.

Ciò in virtù sia del fatto che i risultati di uno dei due tests non sono inferibili dai risultati dell'altro (r = 0.584), sia dell'osservazione secondo cui tale pratica permettere di esaltare il rilievo del gap di prestazione tra verri più o meno votati al congelamento fornendoci dei criteri oggettivi di valutazione per la scelta dei verri. Queste tre prove, perciò rappresentano un metodo di facile attuazione in quanto non richiedono né lunghi tempi d'esecuzione e né soprattutto l'utilizzo di una strumentazione costosa. Pertanto è rivolto sia ai grossi centri di riproduzione e sia alle piccole realtà aziendali. In conclusione, questo test si propone come un valido strumento teso a migliorare l'efficienza riproduttiva del parco verri.

Per quanto riguarda la motilità, il parametro in pratica più comunemente considerato nei centri di fecondazione artificiale, invece, possiamo dire che si tratta di un dato necessario, ma tuttavia non sufficiente. Infatti mediante l' SQA, non sono state evidenziate differenze significative tra lo scongelamento a temperatura ottimale e sub-ottimale. È dunque un metodo meno sensibile rispetto alla valutazione dell'integrità acrosomiale. La motilità infatti non ha un coefficiente di correlazione talmente elevato tale da consentirci di stimare in maniera accurata la percentuale di spermatozoi integri. In altri termini, non possiamo basarci solo sulla valutazione della motilità dopo lo scongelamento, ma dobbiamo valutarla di concerto con l'integrità dell'acrosoma.

Tali prove s'inseriscono nel quadro più ampio d'esperimenti volti a realizzare un'apparecchiatura in grado di consentire il congelamento di grandi volumi di liquido (30 – 50 ml) come richiesto dalle necessità relative al modello riproduttivo suino.