

Sviluppo di nuovi prodotti pro-fertilità per il seme bovino congelato

NUPROFERB

“Progetto finanziato a valere sulla misura 16.2.2 del PSR Umbria 2014-2020 – DD 5653 del 27/06/2016”.

Prof.ssa Bianca Gasparrini
Responsabile Tecnico Scientifico

Dott.ssa Valentina Longobardi



- ❖ Il calo di fertilità registrato in tutti i comparti zootecnici incide negativamente sulla redditività delle aziende, causando allungamenti dell'interparto che si traducono in rilevanti perdite economiche
- ❖ Ipofertilità femminile imputabile all'elevata selezione e alle patologie metaboliche
- ❖ Ipofertilità maschile imputabile alla scarsa qualità del seme

L'Inseminazione Strumentale e la Produzione Embrionale in vitro sono fortemente influenzate da:

- ❖ Qualità del materiale seminale congelato
- ❖ Effetto toro



non raggiungimento degli standard di fertilità minimi dopo il congelamento

Il congelamento determina:

- ❖ danni sub-letali a carico delle cellule spermatiche, con danni ultrastrutturali a livello di membrana e citoscheletro, riduzione della capacità antiossidante, perdita di molecole associate alla fertilità.
- ❖ alterazioni del proteoma del seme, nelle sue componenti sia cellulare sia plasmatica con perdita di proteine extracellulari, coinvolte nel processo fecondativo.

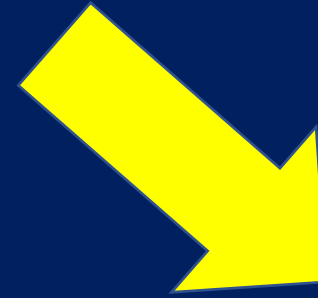
Scopo del progetto: creare nuovi prodotti che migliorino la fertilità del seme congelato bovino per tesaurizzare il materiale seminale di tori di alto valore genetico ipofertili.



reintegrazione post-congelamento
sostanze associate alla fertilità



OBIETTIVO 1



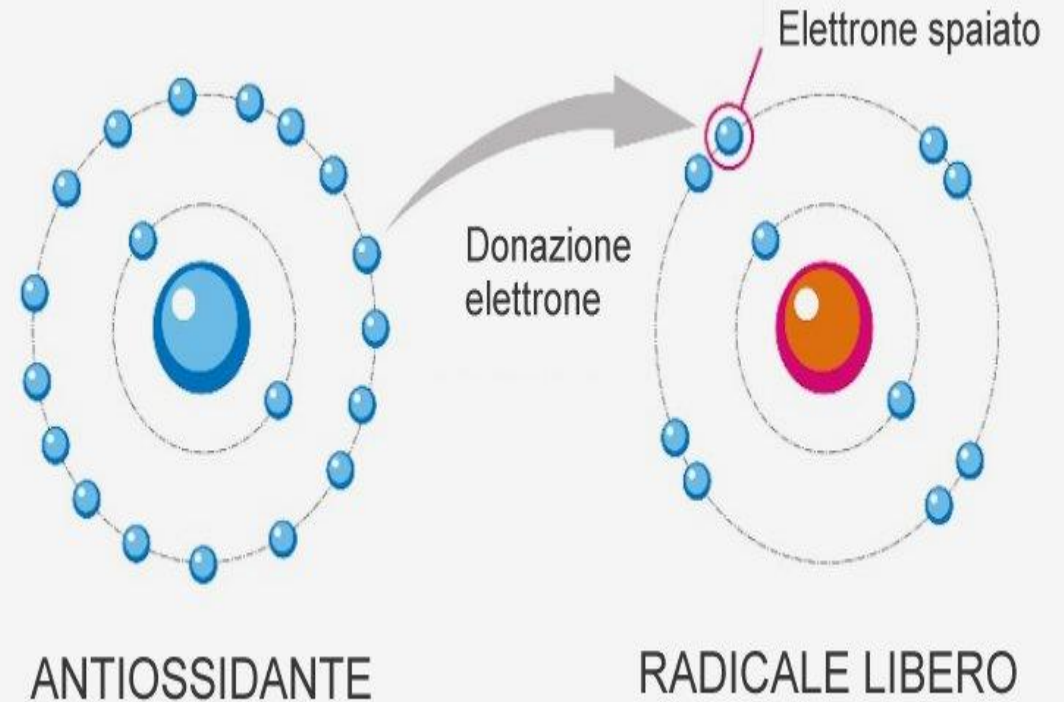
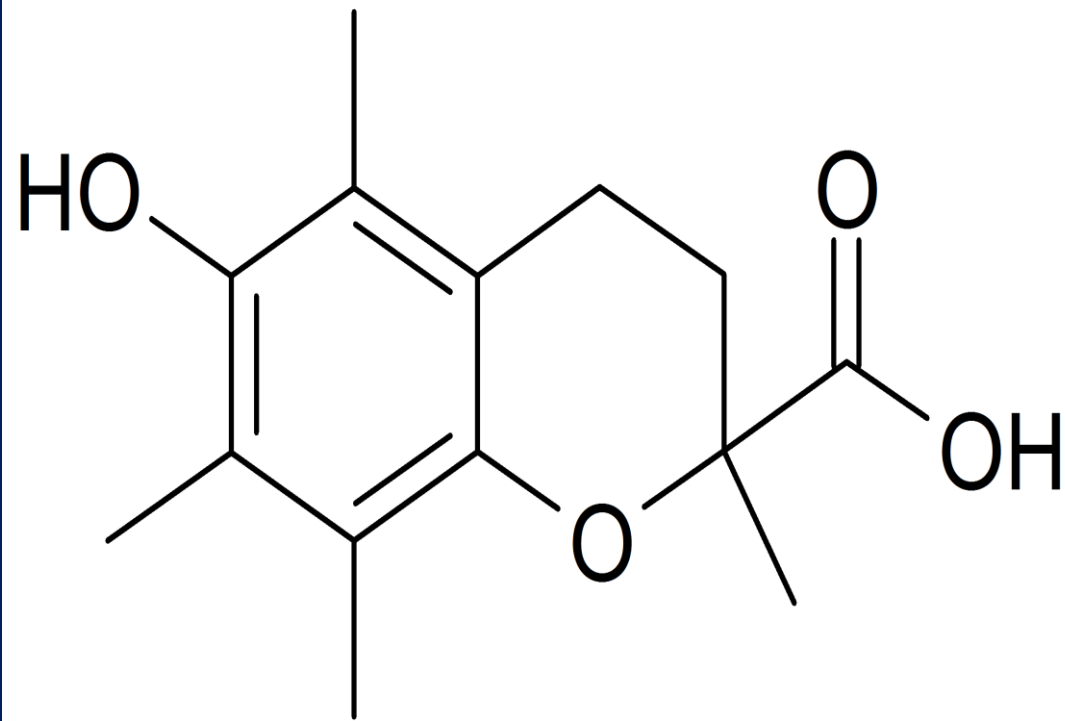
isolare dal liquido seminale
di tori ad alta fertilità
vescicole extracellulari (VE)



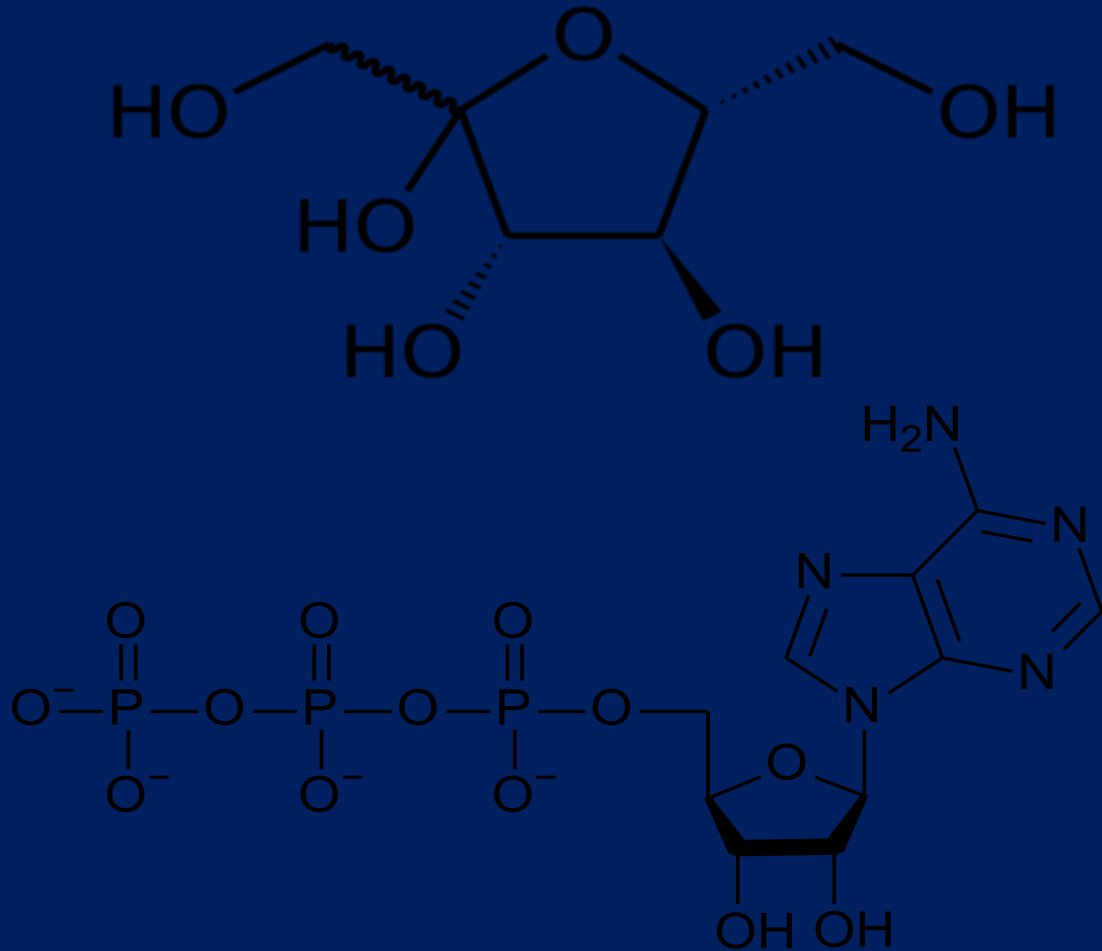
OBIETTIVO 2

Antiossidanti: Trolox


Analogo idrosolubile della vitamina E



Fonti energetiche: Fruttosio e ATP

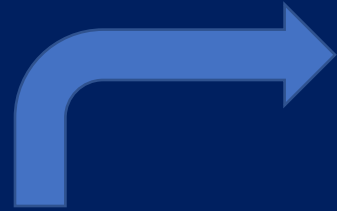


Vescicole Extracellulari (VE)

- ❖ Il plasma seminale contiene elevate concentrazioni di VE in grado di migliorare motilità, attività acrosomiale e capacità fecondante.
- ❖ Aumento della stabilità di membrana mediante l'arricchimento di colesterolo, sfingomieline e glicerofosfolipidi.
- ❖ La composizione del liquido seminale differisce tra tori ad alta e bassa fertilità  **FERTILITY MARKERS**

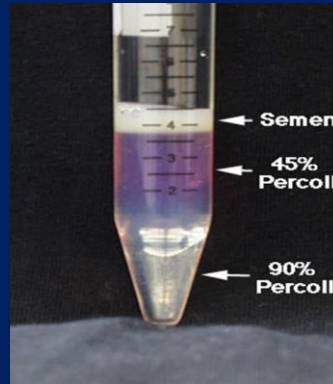
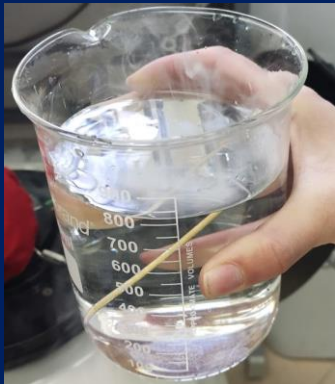
Validazione in vitro dell'efficacia del prodotto 1

- 10 tori bovini
- 80 eiaculati
- seme fresco



Motilità
Vitalità
Morfologia
Capacitazione

Disegno sperimentale



10 min
15 min
20 min



MIX

5.0 mM fruttosio
2.5 mM Atp
0.1 mM Trolox



fertility
parameters

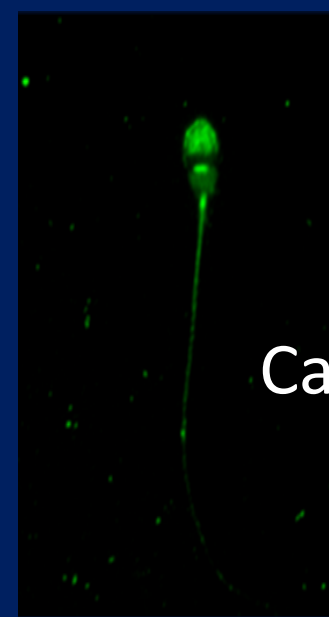
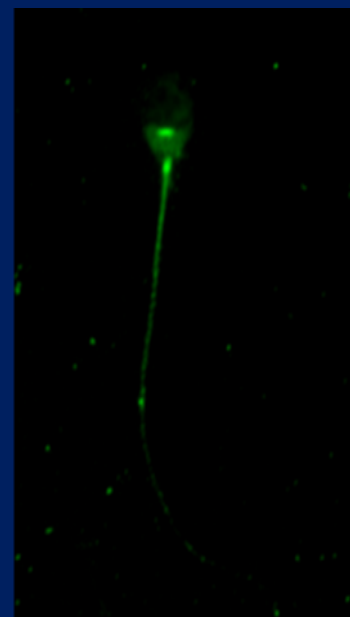
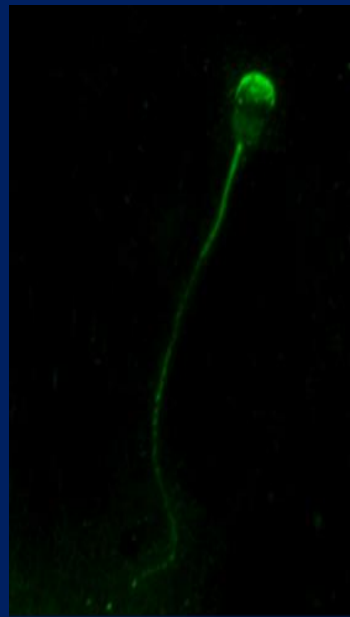
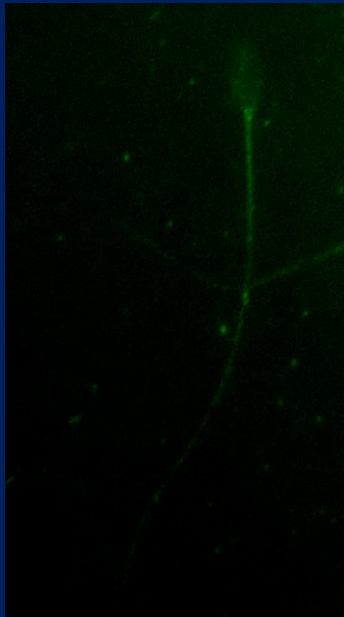
Materiali e metodi



Motilità

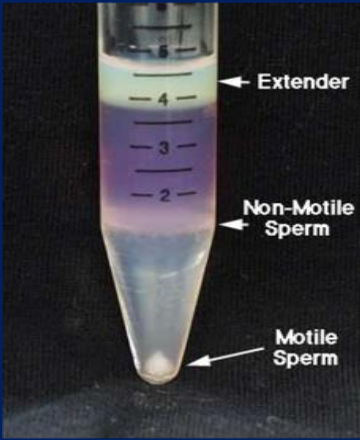
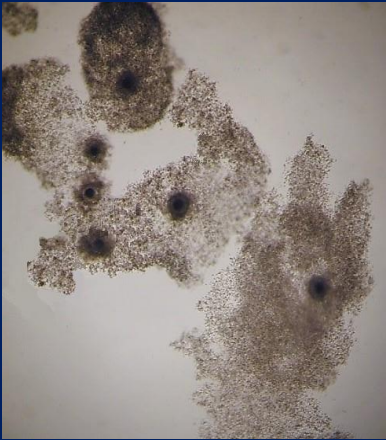


Vitalità e anomalie

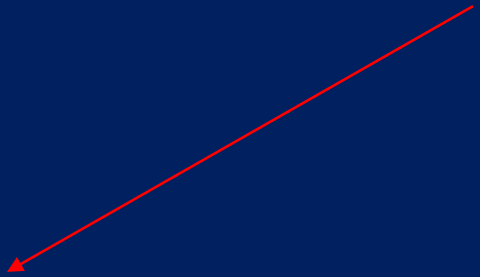
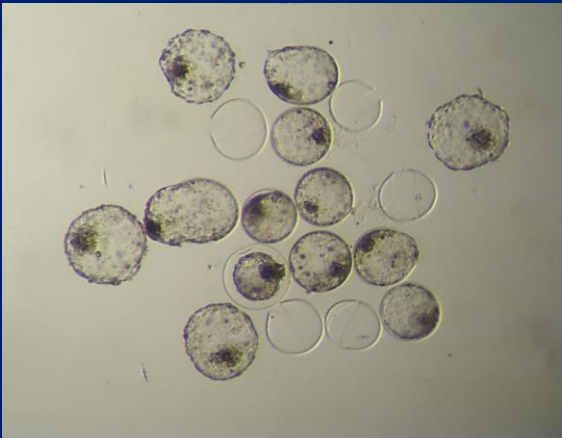


Capacitazione

Materiali e metodi



IVEP



RISULTATI

Gruppi	Tempo	Motilità	Pattern fosforilazione delle proteine tirosiniche				Vitalità
			NF	A	E	EA	
	Min						
Fresco		87.5 ± 0.8 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	92.2 ± 0.9 ^A	0.0 ± 0.0 ^A	7.8 ± 0.9 ^A	92.5 ± 1.8 ^A
Congelato	0	70.7 ± 0.6 ^B	3.0 ± 0.6 ^B	78.1 ± 2.9 ^B	2.1 ± 0.6 ^B	16.8 ± 3.0 ^B	78.7 ± 1.8 ^B
Congelato	10	84.7 ± 0.3 ^A	1.0 ± 0.0 ^B	85.1 ± 1.9 ^B	1.0 ± 0.3 ^B	12.9 ± 4.0 ^{AB}	78.5 ± 0.8 ^B
Congelato	15	85.4 ± 0.6 ^A	2.4 ± 0.1 ^B	83.3 ± 2.6 ^B	3.5 ± 0.6 ^B	10.8 ± 2.0 ^{AB}	75.5 ± 1.0 ^B
Congelato	20	82.3 ± 0.5 ^A	2.5 ± 0.2 ^B	83.7 ± 3.0 ^B	2.1 ± 0.2 ^B	11.7 ± 1.2 ^{AB}	78.3 ± 0.9 ^B

^{A, B} | valori differenti tra le colonne sono statisticamente significativi, P<0.01

RISULTATI

Gruppi	Tempo	Cleavage	TMBL
	Min	%	%
Controllo	0	75.0 ± 0.8 ^A	29.6 ± 0.2 ^A
Trattato	0	76.7 ± 0.6 ^A	32.3 ± 0.9 ^A
Controllo	10	74.7 ± 0.3 ^A	30.1 ± 0.1 ^A
Trattato	10	85.4 ± 0.6 ^B	36.5 ± 0.6 ^B
Controllo	15	74.3 ± 0.5 ^A	28.7 ± 0.4 ^A
Trattato	15	84.1 ± 0.3 ^B	35.8 ± 0.9 ^B
Controllo	20	73.4 ± 0.5 ^A	30.3 ± 0.3 ^A
Trattato	20	82.0 ± 0.8 ^B	36.1 ± 0.3 ^B

^{A, B} I valori differenti tra le colonne sono statisticamente significativi, P<0.01

Screening dei tori ad alta e bassa fertilità

20 tori bovini 80 eiaculati

Qualità	Motilità'	Vitalità	Anomalie	Cleavage	TMBL
Bassa Fertilità	68.3± 0.8	90.1 ± 2.0	32.2 ± 0.5 ^A	62.3 ± 0.5 ^A	19.2 ± 2.0 ^A
Alta Fertilità	70.8± 0.5	93.6 ± 1.5	4.8 ± 0.3 ^B	74.3 ± 1.0 ^B	32.3 ± 2.5 ^B

A, B I valori differenti tra le colonne sono statisticamente significativi, P<0.01

a, b I valori differenti tra le colonne sono statisticamente significativi, P<0.05

Validazione in vitro dell'efficacia del prodotto 2

- 6 tori fertili
- 8 eiaculati

Disegno sperimentale

Isolamento VE → ultracentrifuga a 100.000 g per 1 h a 4 °C → Nanosight



concentrazione: $2,5 \times 10^9$ /ml
dimensioni 171,9 nm

↓
- 80°C

Validazione in vitro dell'efficacia del prodotto 2

Studio preliminare

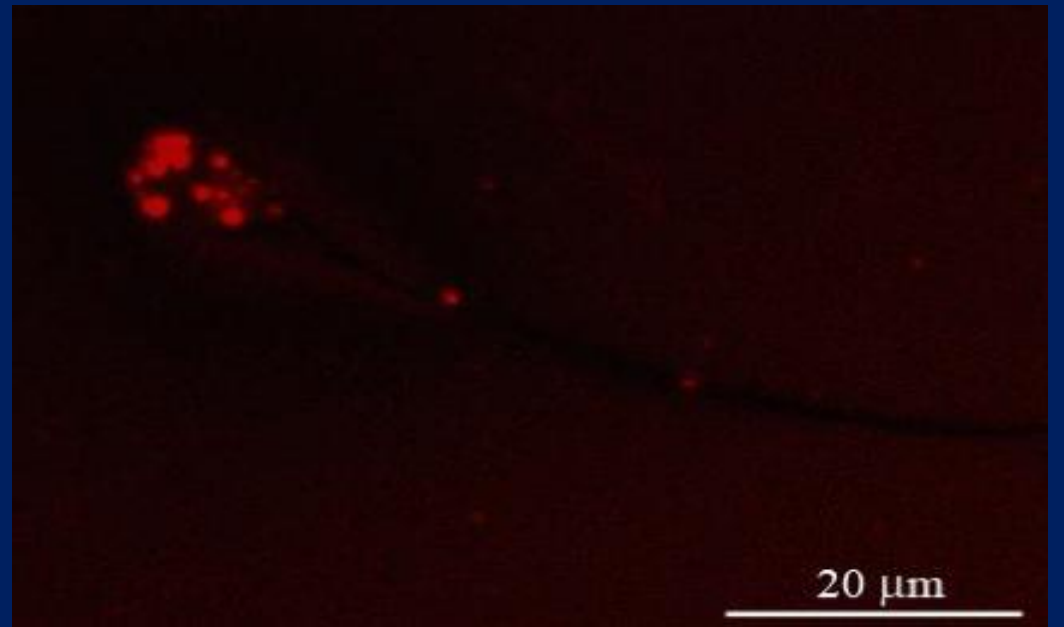
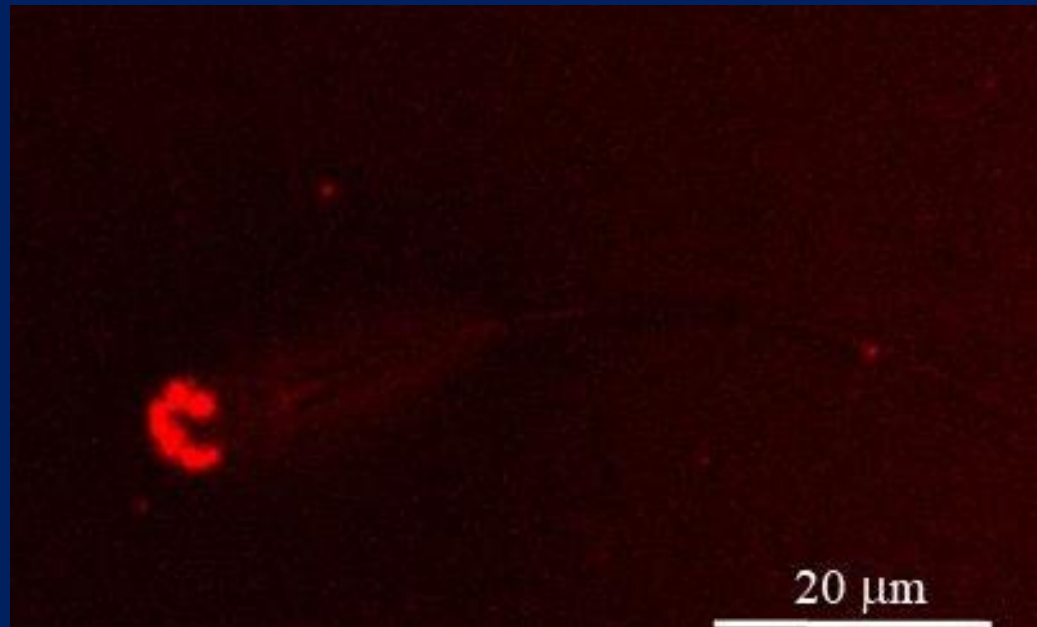
Le VE sono state marcate con un fluorocromo lipofilico e l'incorporazione è stata valutata al confocale.

Risultati

Alla concentrazione di 400×10^6 VE fino a 60 minuti non è stato rilevato alcun segnale fluorescente, a 120' il segnale era all'interno dell'acrosoma e a 180' gli spermatozoi erano colorati per tutta la loro lunghezza.

Conclusioni

Gli spermatozoi bovini sono in grado di incorporare VE provenienti dal plasma seminale ma con tempi decisamente più lunghi di quelli previsti dal progetto. Tuttavia, il Prodotto 2 è stato ugualmente testato in vitro poiché un prodotto che sia in grado di migliorare il tasso di fertilità di tori ipofertili in vitro è altrettanto valido, in quanto permetterebbe di salvaguardare il patrimonio genetico di questi tori che altrimenti andrebbe perduto.



Validazione in vitro dell'efficacia del prodotto 2

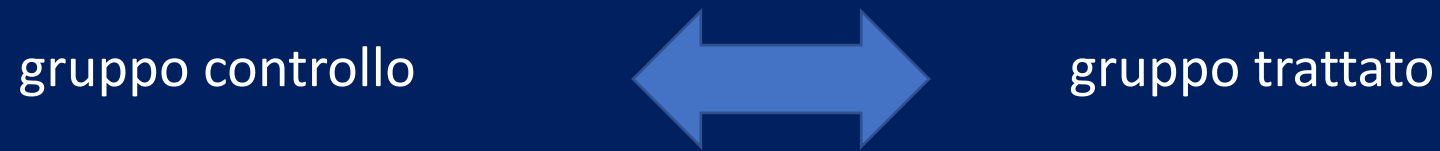
- Le VE isolate dal plasma seminale di tori ad alta fertilità (400×10^6 VE) sono state co-incubate con gli spermatozoi di tori a bassa fertilità (5 tori x 10 eiaculati).

Gruppo	Cleavage	TMBL
Controllo	63.8 ± 1.0^A	16.2 ± 0.9^A
Trattato	74.3 ± 0.8^B	24.8 ± 1.2^B

Fase dimostrativa in campo del prodotto 1 mediante IS

306 soggetti inseminati

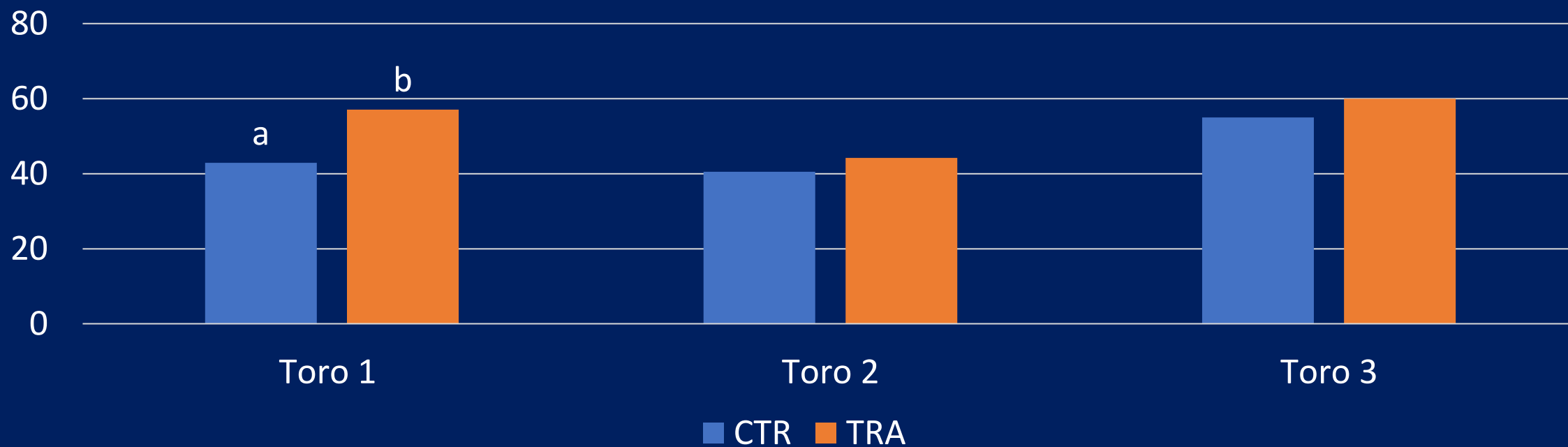
Le bovine sono state individuate previo esame clinico per accertarne le buone condizioni sanitarie e la ciclicità e divise in 2 gruppi di inseminazione:



- Il tempo d' incubazione è stato scelto sulla base dei risultati ottenuti nelle fasi precedenti. Si specifica che anche se non sono emerse differenze significative tra i tempi di incubazione, il gruppo che prevedeva l'incubazione di 10 min ha sempre registrato i parametri migliori.
- Il tasso di fertilità è stato valutato sulla base di soggetti gravidi a 45 giorni post-inseminazione

RISULTATI

- Nessuna differenza è emersa tra il gruppo controllo e il gruppo trattato (45,8 vs 46,4 % rispettivamente). Ma, quando i risultati sono stati analizzati considerando l'effetto toro, il toro 1 ha mostrato un significativo miglioramento ($P < 0.05$) del tasso di fertilità nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo



Prototipizzazione e applicazione commerciale

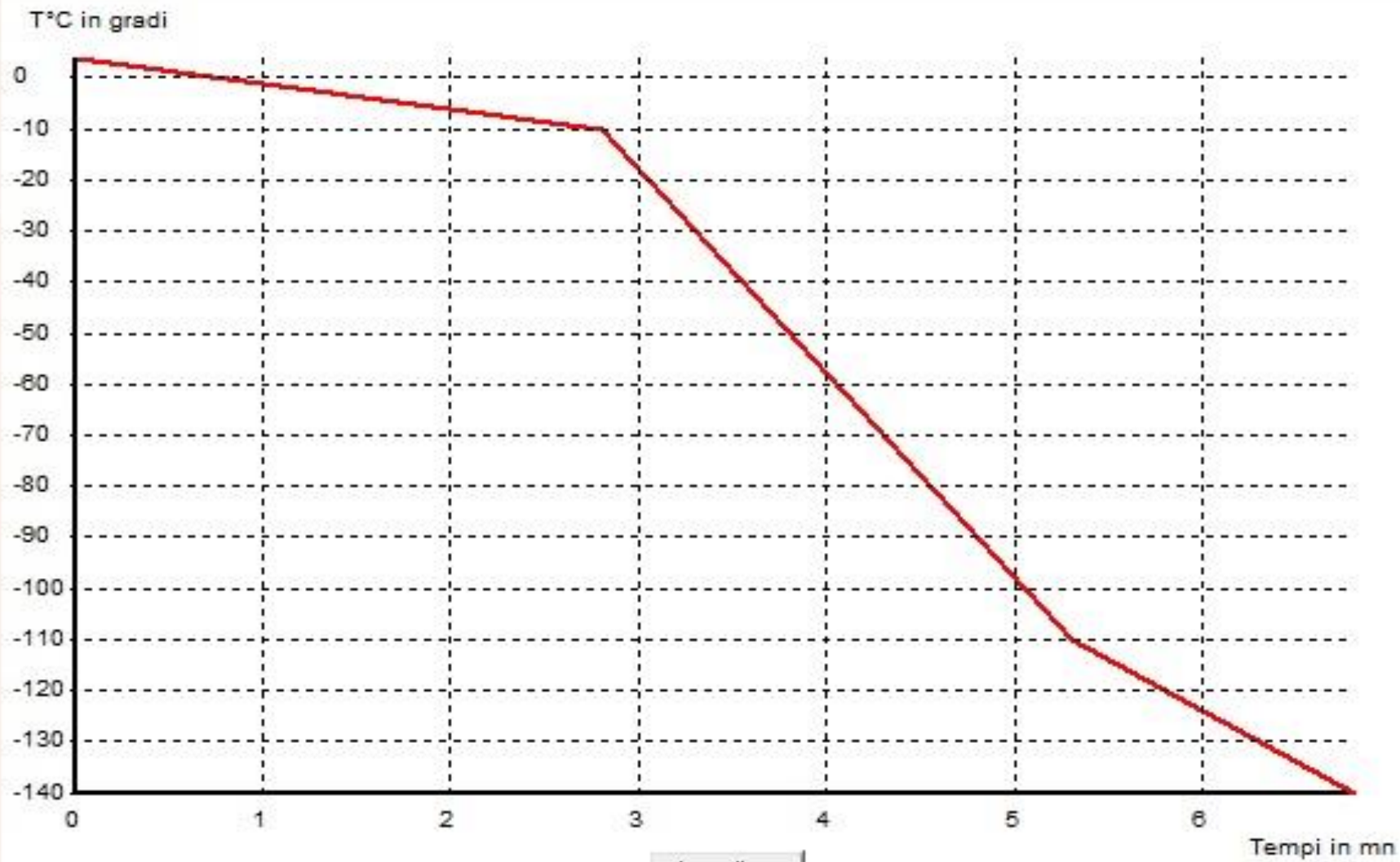
- Scelta del contenitore del Prodotto 1



- Test curve di congelamento al fine di verificare quella idonea a mantenere l'efficacia del prodotto a lungo termine.
- La miscela è stata diluita nell' extender base senza materiale seminale.
- Il processo è stato effettuato ad una temperatura controllata di 4°C presso il locale di condizionamento del centro tori. Il diluitore in presenza e/o in assenza del Prodotto 1 è stato poi sottoposto a confezionamento con l'infialettatrice e poi congelato.



Visualizzazione della curva di congelamento del prodotto 1



Annullare

Vantaggi

- Praticità d'uso e «familiarità»
- Testato per tempi di conservazione e idoneità al trasporto
- Economico
- Ricerca di mercato

CONCLUSIONI

- ❖ Il prodotto 1 ha un effetto benefico sulla qualità del seme bovino crioconservato.
- ❖ Il prodotto 1 migliora la motilità, lo stato di capacitazione e la capacità fecondante in vitro degli spermatozoi bovini crioconservati.
- ❖ Il prodotto 1 influenza positivamente il tasso di fertilità in vivo.

CONCLUSIONI

- ❖ Il prodotto 2 è in grado di migliorare sensibilmente il tasso di fertilità in vitro di tori ipofertili.
- ❖ L'applicabilità del prodotto 2 è limitata perché i tempi d'incorporazione delle VE non sono compatibili con le attività in campo.
- ❖ Il packaging identificato è compatibile con l'applicazione commerciale



LOW COST

EASY TO USE

GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!

