

**PROGRAMMA DI SVILUPPO RURALE PER L'UMBRIA 2007-2013
MISURA 1.2.4 "COOPERAZIONE PER LO SVILUPPO DI NUOVI
PRODOTTI, PROCESSI E TECNOLOGIE NEI SETTORI AGRICOLO E
ALIMENTARE E IN QUELLO FORESTALE"**

RELAZIONE FINALE

Progetto: Processi innovativi e fertilità maschile nei ruminanti
ACRONIMO : PIFEMARU

Domanda di aiuto/rettifica n. 44750057190 ó 44750234658

CAPOFILA/P1:
CENTRO TORI CHIACCHIERINI DI CHIACCHIERINI ANNA

PARTNER:
P2 ó 3 A- Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria; P3- Dipartimento di
Medicina Veterinaria e Produzioni animali (DMVPA) dell'Università degli Studi di
Napoli Federico II; P4- Gruppo Cooperative Agricole di Trevi Società Cooperativa
Agricola

Perugia, 22/10/2015

Il Capofila

1 PREMESSA

La presente relazione finale sulle attività realizzate e sulla rendicontazione delle spese sostenute è stata redatta in conformità con l'art. 8 della Det. Dir. 27 marzo 2009 n. 2860. Il periodo di riferimento a cui fa capo la presente rendicontazione va dalla data di presentazione della domanda di aiuto (20 giugno 2014), al 24 ottobre 2015, coerentemente con i dispositivi attuativi della misura di riferimento.

2 RUOLO SVOLTO DAI PARTNER

P1 e CF Centro Tori Chiacchierini :

Il Centro Tori Chiacchierini ha svolto, nell'ambito del progetto PIFEMARU, il ruolo di CAPOFILA, provvedendo al coordinamento tecnico-organizzativo delle varie azioni. Nello specifico, in quanto soggetto responsabile del buon funzionamento delle fasi del progetto, ha coordinato l'esecuzione delle varie operazioni. A tal fine, sono stati indetti, a cadenza regolare, incontri formali ed informali, per ragguagliare tutti i soggetti partecipanti sullo stato di avanzamento dei lavori e per chiarire ogni problematica emersa nell'ambito dell'attuazione del progetto.

Il capofila, inoltre, ha messo a disposizione i tori bufalini e bovini su cui è stata condotta la sperimentazione e ha fornito il materiale seminale fresco e congelato sul quale il DMVPA ha condotto poi i test di fertilità.

Il capofila, si è infine occupato di collazionare, anche tramite società prestatrice di servizi, i documenti contabili ed amministrativi, compresa la raccolta dei documenti ai fini della creazione della forma organizzata di cooperazione e di tutta la documentazione prevista per la rendicontazione finale delle operazioni.

P2 3 A - PARCO TECNOLOGICO AGROALIMENTARE DELL'UMBRIA

Il Parco 3 A si è occupato dell'attività della divulgazione dei risultati del progetto attraverso la creazione di una pagina web dedicata sul proprio portale e l'organizzazione un seminario conclusivo al termine del progetto.

P3 Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni animali (DMVPA) dell'Università degli Studi di Napoli Federico II

Il DMVPA ha analizzato le condizioni di management delle aziende coinvolte nel partenariato. In particolare valutando le diete alimentari impiegate, le condizioni di benessere e la fertilità dei capi. Presso il Centro Tori, su ogni soggetto in esame il DMVPA ha effettuato prelievi di sangue per la valutazione del profilo ematologico, ormonale e metabolico nonché una valutazione morfologica dei testicoli e dell'epididimo. I testicoli sono stati, inoltre, misurati in tre tempi diversi come riportato successivamente, e il body condition score (BCS) di ogni soggetto in esame è stato registrato.

Inoltre, Il DMVPA ha valutato l'effetto della somministrazione per os di integratori naturali con proprietà antiossidanti sul materiale seminale, mediante test di fertilità. Parallelamente, gli stessi antiossidanti utilizzati per os sono stati aggiunti ai mestruai diluitori per valutare la qualità del materiale seminale post congelamento mediante test di fertilità in vitro. Inoltre, allo scopo di ridurre i danni da criocapacitazione del seme in entrambe le specie, l'extender è stato modificato mediante l'aggiunta di diverse concentrazioni di colesterolo. Sulla base dei risultati ottenuti nei test in vitro, il DMVPA

ha eseguito test di fertilità in vivo mediante Inseminazione Strumentale (IS) nella specie bufalina.

P4 Gruppo Cooperative Agricole di Trevi Società Cooperativa Agricola

L'attività principale dell'azienda è basata sulla selezione di bovine da latte di Razza Frisona. L'azienda è all'avanguardia per la gestione dei capi per la selezione di tori fecondatori appartenenti a linee genetiche di elevata genealogia. Nell'ambito del progetto, il gruppo Cooperative Agricole di Trevi ha condotto prove di fertilità in vivo nella specie bovina utilizzando il materiale seminale trattato con gli antiossidanti. Inoltre tale partner si è occupato del monitoraggio dell'andamento delle gravidanze mediante indagine ultrasonografica.

3 ATTIVITÀ SVOLTE

Le attività svolte e rendicontate nella presente relazione finale hanno riguardato le seguenti fasi progettuali:

- Fase 1 - Stipula dell'ATS e fase di studio preliminare
- Fase 2 - Sperimentazione
- Fase 3 - Applicazione
- Fase 4 - Divulgazione dei risultati

3.1 Fase 1: Stipula dell'ATS e fase di studio preliminare

Tutti i partner del progetto hanno sottoscritto apposito contratto di Associazione temporanea di scopo (ATS) in data 18/12/2014, nel quale hanno formalizzato gli intenti previsti dall'Accordo di partenariato allegato alla domanda di aiuto del progetto. Lo stesso è stato registrato presso l'Agenzia delle Entrate di Perugia in data 18/12/2014. Sono stati organizzati due incontri tra i soggetti partecipanti all'ATS: uno per definire il protocollo operativo, al fine di stabilire le linee guida per l'adonea gestione del progetto e per l'implementazione della relativa logistica e l'altro per il coordinamento tecnico scientifico. Il protocollo operativo è stato approvato da tutti i partner.

Inoltre, in questa fase sono state analizzate le condizioni di management del Centro Tori e della Società Cooperativa Agricola di Trevi in qualità di aziende coinvolte nel partenariato.

Valutazione dell'azienda agricola Centro Tori Chiacchierini

L'azienda agricola Centro Tori Chiacchierini di Anna Chiacchierini è un'azienda la cui attività produttiva si esplica attraverso l'esercizio delle coltivazioni agricole associate all'allevamento di tori da riproduzione bovini e bufalini, di elevata genealogia, per la produzione di materiale seminale congelato, attraverso un Centro di Fecondazione Artificiale, riconosciuto ai sensi delle normative italiana ed europea vigenti.

Il Centro ha la più grande banca di materiale seminale di Razza Chianina, e inoltre seleziona materiale seminale delle maggiori razze bovine ad attitudine latte (Holstein Friesian) e di razze di pregio per la produzione di carne (Marchigiana, Podolica, Romagnola, Limousine, Blan Bleu Belge). Dal 2000, il Centro ha inoltre implementato l'attività di selezione con un programma di progenie condotto sulla Bufala Mediterranea Italiana, con tori ai vertici delle graduatorie di selezione per progenie.

Il corpo aziendale si estende per circa 20 ettari, che rappresentano un cordone sanitario in grado di isolare completamente i locali di stabulazione degli animali. L'area che

ricomprende l'azienda è a bassissima densità zootecnica e il Centro è provvisto di stalla di quarantena a prova di insetto, riconosciuta a livello ministeriale, per il monitoraggio della diffusione della Blue Tongue. Tutto il seme prodotto è soggetto a campionatura qualitativa da parte dell'Istituto Sperimentale Italiano Lazzaro Spallanzani, Ente istituzionalmente preposto. I tori sono alimentati con fieno, paglia e concentrato prodotto in loco dallo stesso Centro Tori.



Figura 1, Laboratorio Centro Tori Chiacchierini



Figura 2, Sala congelamento materiale seminale

Il DMVPA ha valutato il body condition score (BCS) dei tori presenti presso il Centro Tori, tramite apprezzamento visivo e tattile di alcune zone ben precise dell'animale, individuabili sostanzialmente a livello della natica, della base della coda e della zona lombare. Il BCS può essere considerato un utile strumento d'analisi della gestione aziendale, in grado di fornire delle indicazioni di massima sull'appropriatezza delle razioni impiegate e sul "management" della stalla. In particolare, tale metodo si basa su una scala da 1 a 5 per il bovino: il punteggio 1 corrisponde ad un soggetto sottopeso, emaciato, mentre 5 indica un soggetto obeso. Per il bufalo, invece, si utilizza in Italia la scala di Wagner, opportunamente modificata che consta di nove punti che variano in funzione dell'abbondanza dei depositi adiposi localizzati nelle regioni seguenti: groppa, base della coda, fianco, torace, punta di petto. L'obesità può essere infatti la risultante di un'alimentazione non adeguata, e un toro troppo grasso è quasi

sicuramente soggetto ad aumento dell'incidenza di problemi metabolici e cali produttivi del materiale seminale. Un'eccessiva magrezza invece può causare abbassamenti di produzione e conseguente decremento della qualità seminale a causa delle insufficienti riserve d'energia e proteine.

Per quanto riguarda i soggetti bovini, il BCS è risultato compreso tra 3 e 3.5, mentre per i soggetti bufalini tra 5 e 7. Lo stato di benessere generale è risultato negli standard per cui si è proceduto a selezionare i tori da utilizzare nella fase di sperimentazione. In particolare sono stati selezionati 12 tori bufalini e 12 tori bovini.



Figura 3, toro bovino durante la valutazione del BCS



Figura 4, Toro bufalino durante la valutazione del BCS

Per ogni soggetto selezionato sono state effettuate indagini ultrasonografiche dei testicoli e dell'epididimo mediante eco color-Doppler per visualizzare il flusso sanguigno dei vasi a livello testicolare ed epididimale, sono state misurate le dimensioni dei testicoli e prelevato il sangue alla vena giugulare per valutare il profilo ematologico, ormonale e metabolico al tempo 0, cioè prima della somministrazione degli antiossidanti. È importante sottolineare che la conoscenza della morfologia e delle dimensioni dell'apparato genitale maschile è strettamente correlata all'efficienza riproduttiva in quanto il peso testicolare è correlato alla capacità di produrre seme. Inoltre adeguati livelli di testosterone, l'ormone androgeno maggiormente circolante nel maschio, sono essenziali per una corretta spermatogenesi. La definizione dei profili ematologico, ormonale e metabolico è un indicatore dello stato di benessere e nutrizionale degli animali. I soggetti in esame, sia bovini che bufali, presentavano una vascolarizzazione nella norma, testicoli ed epididimo in posizione e senza alterazioni di forma e volume.

I campioni di sangue sono stati raccolti, mediante prelievo alla vena giugulare, in provette da 10 mL contenenti EDTA, per le analisi ematologiche, senza anticoagulante per i dosaggi ormonali e con eparina per il dosaggio metabolico. I campioni sono stati immediatamente omogeneizzati e stoccati in ghiaccio. Le concentrazioni sieriche delle proteine totali e della creatinina sono state misurate con un analizzatore automatico Biosystem. Le piastrine sono state contate in una camera di Neubauer usando specifici reagenti. La conta completa delle cellule del sangue è stata fatta mediante un cell counter CEKM. I campioni raccolti in eparina sono stati centrifugati a 3000rpm x 10 min per la separazione del plasma. Aliquote da 1.5 mL sono state trasferite in eppendorf (2 per animale) e stoccate a -80°C per le successive analisi metaboliche. I livelli plasmatici di glucosio, urea ed insulina sono stati determinati colorimetricamente tramite saggio Elisa. Per ciò che concerne il dosaggio ormonale del testosterone, i campioni senza anticoagulante, sono stati centrifugati a 2500g x 10min, il surnatante è stato raccolto e immediatamente congelato a -20°C fino al saggio ormonale effettuato mediante RIA.

I risultati del profilo ematologico, metabolico e ormonale sono riportati in Tabella 1 e 2 rispettivamente per i tori bovini e quelli bufalini. I dati riportati nelle tabelle rientrano nei range fisiologici delle specie prese in esame, suggerendo quindi una condizione ottimale di benessere.

Tabella 1, Profilo ematologico, metabolico ed ormonale bovino

Valori ematologici	
Globuli rossi ($10^9/L$)	7.05 ± 0.75
Ematocrito (%)	40.7 ± 1.16
Emoglobina (g/dL)	13.5 ± 0.41
Media volume corpuscolare (fL)	64.1 ± 9.59
Piastrine ($10^9/L$)	419 ± 32.9
Linfociti (%)	59.2 ± 5.88
Neutrofili (%)	34.7 ± 5.44
Leucociti ($10^9/L$)	13.7 ± 1.50
Valori metabolici	
Glucosio (mg/dL)	60.2 ± 6.35
Creatinina (mg/dL)	1.51 ± 0.18
Urea (mg/dL)	27.7 ± 3.29
Proteine totali (g/dL)	6.30 ± 0.13
Valori ormonali	
Testosterone (ng/mL)	0.60 ± 0.65
Insulina ($\mu IU/mL$)	4.03 ± 1.03

Tabella 2, Profilo ematologico, metabolico ed ormonale bufalino

Valori ematologici	
Globuli rossi ($10^9/L$)	6.6 ± 1.5
Ematocrito (%)	39.2 ± 9.6
Emoglobina (g/dL)	12.3 ± 2.6
Media volume corpuscolare (fL)	59.6 ± 8.9
Piastrine ($10^9/L$)	190.7 ± 79.3
Linfociti (%)	60.8 ± 9.2
Neutrofili (%)	34.3 ± 9.1
Leucociti ($10^9/L$)	14.5 ± 6.6
Valori metabolici	
Glucosio (mg/dL)	62.84 ± 0.96
Creatinina (mg/dL)	1.29 ± 0.04
Urea (mg/dL)	37.87 ± 0.66
Proteine totali (g/dL)	5.78 ± 0.97
Valori ormonali	
Testosterone (ng/mL)	1.64 ± 0.08
Insulina (pmol/L)	88.20 ± 4.35

Valutazione della Società Cooperativa Agricola di Trevi

La Società Cooperativa Agricola di Trevi si estende per circa 200 ha di superficie agricola, di cui 150 ha sono impiegati per la produzione di foraggi destinati al bestiame.

L'attività principale dell'azienda è basata sulla selezione di bovine da latte di Razza Frisone Italiana, si contano circa 600 capi totali, di cui vacche in produzione 330. L'azienda è all'avanguardia per la gestione dei capi per la selezione di tori fecondatori appartenenti a linee genetiche di elevata genealogia. Lo staff aziendale è composto da un direttore tecnico P.A., un veterinario aziendale, un consulente alimentare, un capostalla e quattro operai. I piani alimentari prevedono la somministrazione di una razione UNIFEED unica per i soggetti in lattazione, in asciutta e oltre i sei mesi di età. La fertilità della mandria sulla base dei dati raccolti è nella media, in particolare il n° inseminazioni/capo vacca = 3,16 e il n° inseminazioni/capo manza = 1,6. Le produzioni medie di latte sono pari a q.li 107/vacche in lattazione, 33 L/giorno/capo. Il metodo di riproduzione attuato nell'azienda è per il 100% dei capi l'inseminazione strumentale.



Figura 5, Centro zootecnico Società Cooperativa Agricola di Trevi - Corsia di alimentazione



Figura 6, Centro zootecnico Società Cooperativa Agricola di Trevi – zona stabulazione Bovine Razza Frisona



Figura 7, Centro zootecnico Società Cooperativa Agricola di Trevi - momento del parto

Tempistica d'attuazione

Le attività svolte dal DMVPA sono state effettuate, in modo più o meno continuativo, dal settembre 2014 al gennaio 2015.

Il Centro Tori Chiacchierini ha messo a disposizione da novembre 2014 a gennaio 2015 dati e strutture aziendali, oltre che il personale per le valutazioni preliminari al progetto. Nel medesimo lasso di tempo la Società Cooperativa Agricola di Trevi ha fornito i dati produttivi aziendali, che sono stati oggetto di analisi da parte del DMVPA. In questo ultimo caso non è stato necessario l'utilizzo di personale aziendale.

3.2 Fase 2: Sperimentazione

In questa fase, con cadenza mensile, si sono tenute n° 3 riunioni di coordinamento tecnico scientifico al fine di programmare le attività e i tempi di attuazione.

Aggiunta di antiossidanti per os

Si ritiene opportuno specificare che la scelta degli antiossidanti da utilizzare nella sperimentazione si è indirizzata su resveratrolo e carnitina, in quanto una sperimentazione parallela svolta dal DMVPA aveva fornito risultati molto promettenti sulle colture embrionali (Boccia et al., 2013; Salzano et al., 2014). Per quanto concerne la sperimentazione, gli animali sono stati suddivisi in due gruppi per ogni specie, il primo è stato alimentato con la razione standard descritta in precedenza che soddisfa i fabbisogni di accrescimento (gruppo controllo), mentre il secondo gruppo ha ricevuto la stessa dieta, ma integrata con gli antiossidanti al fine di ridurre gli effetti negativi dello stress e migliorare la fertilità (gruppo trattato). In particolare sono stati selezionati 6

bovini per il gruppo controllo e 6 bovini per il gruppo trattato. Per i bufali, allo stesso modo, sono stati selezionati 6 tori per il gruppo controllo e 6 tori per il gruppo trattato. Il DMVPA, con cadenza mensile, ha visitato gli animali, misurato il BCS e prelevato il sangue (3 prelievi) così come descritto in precedenza, per valutare l'effetto della somministrazione per os degli antiossidanti sullo stato di benessere degli animali. Nell'arco dei 100 giorni non è stata evidenziata nessuna variazione sostanziale nello stato di benessere degli animali; il BCS è rimasto costante e non sono state rilevate alterazioni nei livelli ematici, metabolici ed ormonali in entrambe le specie. Nelle Tabelle 3 e 4 sono riportate le medie dei diversi parametri registrate al termine della sperimentazione, rispettivamente nei bovini e nei bufali.

Tabella 3, BCS, Profilo ematologico, metabolico ed ormonale bovino

BCS	
3 ó 3.5	
Valori ematologici	
Globuli rossi ($10^9/L$)	6.9 ± 1.1
Ematocrito (%)	42.3 ± 0.9
Emoglobina (g/dL)	12.5 ± 0.5
Media volume corpuscolare (fL)	66.1 ± 7.0
Piastrine ($10^9/L$)	396 ± 30.7
Linfociti (%)	57.1 ± 3.1
Neutrofili (%)	35.7 ± 4.3
Leucociti ($10^9/L$)	12.5 ± 1.0
Valori metabolici	
Glucosio (mg/dL)	61.3 ± 5.5
Creatinina (mg/dL)	1.67 ± 0.1
Urea (mg/dL)	29.4 ± 2.0
Proteine totali (g/dL)	6.42 ± 0.01
Valori ormonali	
Testosterone (ng/mL)	0.68 ± 0.6
Insulina ($\mu IU/mL$)	4.53 ± 1.1

Tabella 4, BCS, Profilo ematologico, metabolico ed ormonale bufalino

BCS	
5-7	
Valori ematologici	
Globuli rossi ($10^9/L$)	6.3 ± 1.0
Ematocrito (%)	38.7 ± 8.0
Emoglobina (g/dL)	11.3 ± 2.0
Media volume corpuscolare (fL)	61.6 ± 6.3
Piastrine ($10^9/L$)	186.7 ± 65.3
Linfociti (%)	62.1 ± 6.2
Neutrofili (%)	34.3 ± 8.2
Leucociti ($10^9/L$)	15.4 ± 5.3
Valori metabolici	
Glucosio (mg/dL)	60.64 ± 0.1
Creatinina (mg/dL)	1.18 ± 0.1
Urea (mg/dL)	35.77 ± 1.7
Proteine totali (g/dL)	6.38 ± 0.1
Valori ormonali	
Testosterone (ng/mL)	1.44 ± 0.2
Insulina (pmol/L)	86.30 ± 3.6

Sono state inoltre condotte prove sperimentali preliminari su scala ridotta, per individuare l'effetto degli antiossidanti per os sulla qualità del seme. In particolare sono state valutate la motilità, la vitalità, l'integrità della membrana e lo stato di capacitazione, nonché la capacità fecondante in vitro. La motilità è stata valutata mediante un microscopio a contrasto di fase (Nikon Diaphot 300) con un obiettivo 40x su un piano riscaldato a 37°C. La vitalità è stata, invece, valutata mediante la colorazione Trypan blue/ Giemsa (Figura 8), che consente di differenziare gli spermatozoi vivi (rosa) da quelli morti (viola).

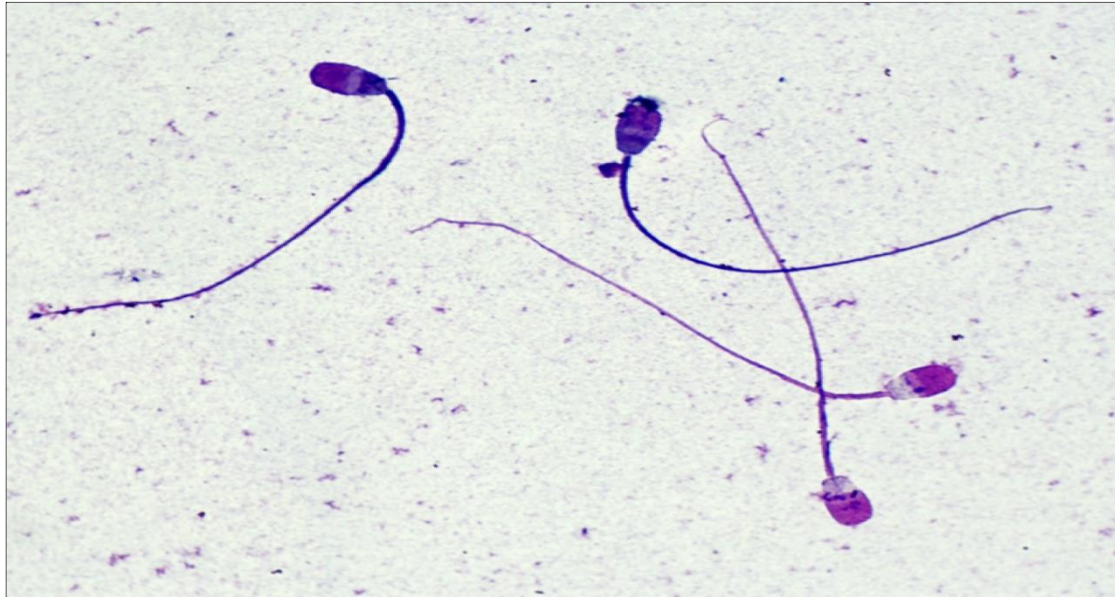


Figura 8, Spermatozoi di bufalo vivi e morti evidenziati alla colorazione Trypan Blue/Giemsa.

Per quanto riguarda la motilità e la vitalità i risultati sono riportati in Tabella 5 per la specie bovina e in Tabella 6 per la specie bufalina. Le tabelle mostrano le percentuali complessive dei soggetti presi in esame all'inizio della sperimentazione (tempo 0), dopo 30 giorni (tempo 1) e dopo 60 giorni (tempo 2). Per ogni toro (12 per specie) sono stati prelevati n° 3 eiaculati consecutivi per ogni tempo (0, 1, 2) per un totale di 216 eiaculati, sui quali il DMVPA ha condotto le prove sperimentali sia presso il Capofila Centro Tori Chiacchierini che presso il Laboratorio di Biotecnologie Applicate all'Allevamento Animale. Si riferisce che è stato necessario prelevare il seme separatamente per ciascuna specie per rispettare una tempistica compatibile con un rientro in giornata del personale del DMVPA, finalizzato alla processazione del materiale raccolto presso il laboratorio dedicato. Ne consegue che sono state svolte 18 missioni per il recupero del materiale seminale destinato a questa finalità. In particolare per ogni toro, sono stati eseguiti 108 test di motilità e vitalità e 108 test della Clortetraciclina (CTC assay) per un totale di 216/per specie, per condurre prove sperimentali di valutazione della qualità del materiale seminale a fronte delle 128 previste.

Tabella 5, Parametri di motilità e vitalità rilevati a diversi tempi nel bovino

TEMPO	GRUPPO	MOTILITÀα(%)	VITALITÀα(%)
0	controllo	77.50 \pm 0.05	77.42 \pm 1.11
1	controllo	73.33 \pm 0.76	75.75 \pm 0.81
2	controllo	76.67 \pm 1.01	76.67 \pm 0.60
0	trattato	74.17 \pm 0.92	76.08 \pm 0.40
1	trattato	74.17 \pm 0.89	78.50 \pm 0.37
2	trattato	75.83 \pm 0.56	78.33 \pm 0.67

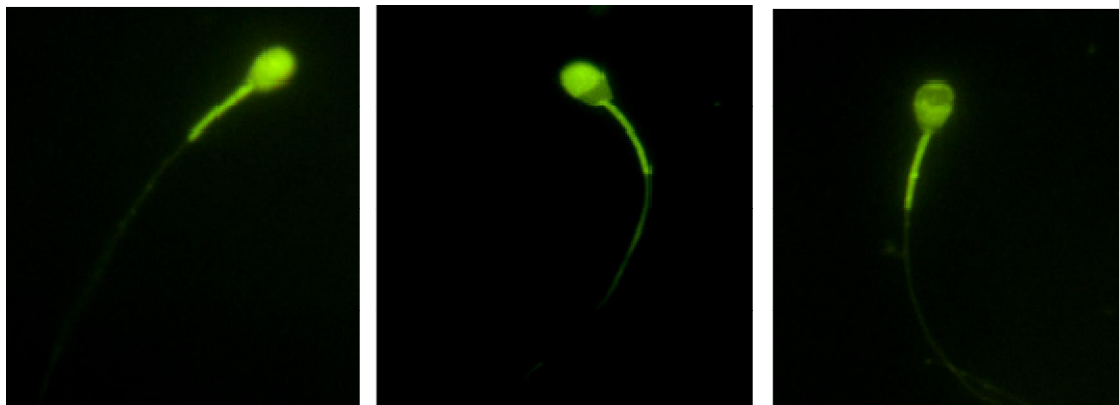
Tabella 6, Parametri di motilità e vitalità rilevati a diversi tempi nel bufalo

TEMPO	GRUPPO	MOTILITÀα(%)	VITALITÀα(%)
0	controllo	70.67 \pm 0.55	71.73 \pm 1.01
1	controllo	74.67 \pm 0.66	76.93 \pm 0.75
2	controllo	74.00 \pm 1.01	75.13 \pm 0.53
0	trattato	74.67 \pm 0.66	76.27 \pm 0.49
1	trattato	69.33 \pm 1.09	76.00 \pm 0.47
2	trattato	68.67 \pm 0.78	78.80 \pm 0.67

Come si evince dai risultati inseriti nelle tabelle 5 e 6, non sono emerse differenze significative tra i gruppi controllo e trattato a nessun tempo. È importante sottolineare che la qualità del seme di partenza è comunque elevata, ciò indica che la somministrazione degli antiossidanti per os non ha alterato né migliorato la qualità seminale.

Inoltre, è stata valutata l'integrità di membrana spermatica mediante CTC assay. In particolare sono stati analizzati tre pattern di fluorescenza: Pattern F, che indica l'assenza di capacitazione e quindi indirettamente una membrana integra; Pattern B, che indica invece uno spermatozoo capacitato e indirettamente un danno di membrana indotto dalla procedura di congelamento/scongelo; Pattern AR, che indica l'avvenuta reazione acrosomiale con la perdita totale dell'acrosoma e gravi alterazioni dell'integrità di membrana (Figura 9).

I risultati relativi al CTC assay sono riportati in Tabella 7 per i bovini e in Tabella 8 per i bufali.



B- pattern

F- pattern

AR-pattern

Figura 9, Pattern del CTC assay

Tabella 7, Percentuali dei pattern del CTC assay nel bovino

TEMPO	GRUPPO	n	F	B	AR
0	controllo	1500	57.83 ± 1.01	38.83 ± 1.67	3.33 ± 1.59
1	controllo	1500	56.42 ± 1.81	40.83 ± 1.51	2.75 ± 1.45
2	controllo	1500	55.92 ± 2.01	42.17 ± 2.11	1.92 ± 1.11
0	trattato	1500	54.17 ± 2.10	43.08 ± 1.86	2.75 ± 1.18
1	trattato	1500	53.75 ± 1.25	43.25 ± 1.23	3.00 ± 1.76
2	trattato	1500	52.58 ± 1.76	44.33 ± 1.55	3.08 ± 2.24

Tabella 8, Percentuali dei pattern del CTC assay nel bufalo

TEMPO	GRUPPO	n	F	B	AR
0	controllo	1500	57.83 ± 1.01	38.83 ± 1.67	3.33 ± 1.59
1	controllo	1500	56.42 ± 1.81	40.83 ± 1.51	2.75 ± 1.45
2	controllo	1500	55.92 ± 2.01	42.17 ± 2.11	1.92 ± 1.11
0	trattato	1500	54.17 ± 2.10	43.08 ± 1.86	2.75 ± 1.18
1	trattato	1500	53.75 ± 1.25	43.25 ± 1.23	3.00 ± 1.76
2	trattato	1500	52.58 ± 1.76	44.33 ± 1.55	3.08 ± 2.24

Anche in questo caso non sono emerse variazioni dovute al trattamento con gli antiossidanti per os contrariamente a quanto atteso. Per questo motivo, non si è proceduto all'utilizzazione del materiale seminale prodotto dai tori controllo e trattato presi in esame, per i test di fertilità in vitro.

È importante sottolineare, così come sarà descritto successivamente, che i risultati più significativi sono emersi quando il materiale seminale è stato diluito con appositi mestruai innovativi con proprietà antiossidanti. Per questo motivo, la sperimentazione su scala pilota, che prevedeva 24 prove (12 per specie) di fertilità in vitro per ogni eiaculato dei tori trattati per os e rispettivi controlli, è stata invece destinata solo alle prove di fertilità in vitro con materiale seminale diluito con il mestruo standard e con

quelli innovativi contenenti gli antiossidanti e gli steroli. Per i suddetti motivi, sono state effettuate 27 missioni per prelievo di ovaie al macello invece delle 32 previste.

Aggiunta di antiossidanti e steroli nell'extender

Si ritiene opportuno specificare che nel corso della sperimentazione con gli antiossidanti (resveratrolo e carnitina) è emerso un dato molto interessante, riferibile ad un elevato stato di capacitazione post-congelamento, particolarmente accentuato nella specie bufalina. Infatti, il CTC assay ha evidenziato che nel seme del gruppo controllo la percentuale di spermatozoi con pattern B (capacitati) era piuttosto alta in entrambe le specie (circa il 60% vs il 15% del seme fresco). In particolare, nel seme di bufalo la percentuale di spermatozoi in uno stato avanzato di capacitazione, valutato mediante il test della fosforilazione delle proteine tirosiniche (Pattern EA), era molto maggiore (40 e 14%, rispettivamente nelle specie bufalina e bovina). Questo risultato ci ha indotti a pianificare una strategia alternativa per il miglioramento della qualità del materiale seminale, che consisteva nell'aggiunta all'extender di colesterolo coniugato a ciclodestrine per stabilizzare la membrana spermatica prima del congelamento. Ne consegue che in questa fase sono state utilizzate 3 sostanze (resveratrolo, carnitina e colesterolo). La variabilità intraindividuale registrata sui primi eiaculati raccolti ha inoltre suggerito di incrementare il campionamento di seme per ridurre l'effetto replica, per cui per ciascuna sostanza sono stati raccolti 6 eiaculati/toro rispetto ai 4 previsti originariamente nella fase di stesura del progetto. Poiché i prelievi del materiale seminale sono stati effettuati in giornate diverse, per i motivi precedentemente riferiti, le missioni svolte per questa finalità sono state 36.

In particolare, per ogni sostanza sono state testate due concentrazioni: resveratrolo (10 e 50 μ M), carnitina (2.5 e 7.5 mM) e colesterolo (1.5 e 3 mg/mL). Ogni eiaculato è stato quindi diviso in tre aliquote, una diluita con il mestruo standard e due con il mestruo contenenti le due concentrazioni per ogni rispettivo antiossidante e sterolo. Su ogni eiaculato sono stati eseguiti test di motilità, vitalità, integrità della membrana e stato di capacitazione (CTC assay e fosforilazione delle proteine tirosiniche) nonché la capacità fecondante in vitro con test di penetrazione omologa. Il test di fosforilazione delle proteine tirosiniche permette di valutare il grado di capacitazione degli spermatozoi identificato da 4 pattern di fluorescenza (Figura 10):

- non fluorescente (NF): assenza di fluorescenza, non capacitato;
- pattern A: basso livello di capacitazione, fluorescenza uniforme nella zona acrosomiale;
- pattern E: medio livello di capacitazione, sottile linea di fluorescenza nella parte equatoriale;
- pattern EA: alto livello di capacitazione, fluorescenza sia nella zona equatoriale che acrosomiale.

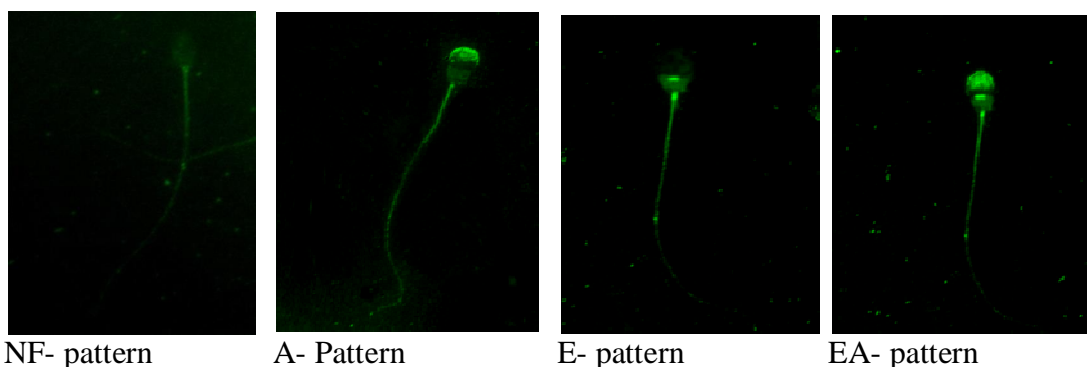


Figura 10, Pattern di fosforilazione delle proteine tirosiniche

La valutazione della fertilità in vitro, parametro che misura l'effettiva capacità fecondante del seme, è stata effettuata utilizzando oociti prelevati (figura 11) mediante l'aspirazione follicolare da ovaie recuperate in sede di macellazione. La capacità fecondante e il contributo paterno allo sviluppo embrionale sono stati valutati mediante i tassi di penetrazione, il cleavage (divisione a 2 cellule) e la resa in embrioni trasferibili, cioè blastocisti al settimo giorno di coltura (Figura 12).

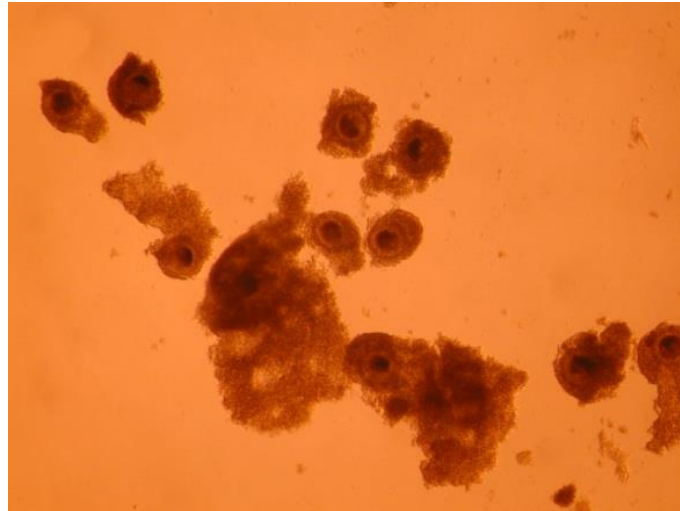


Figura 11, oociti di bufalo di grado A e B

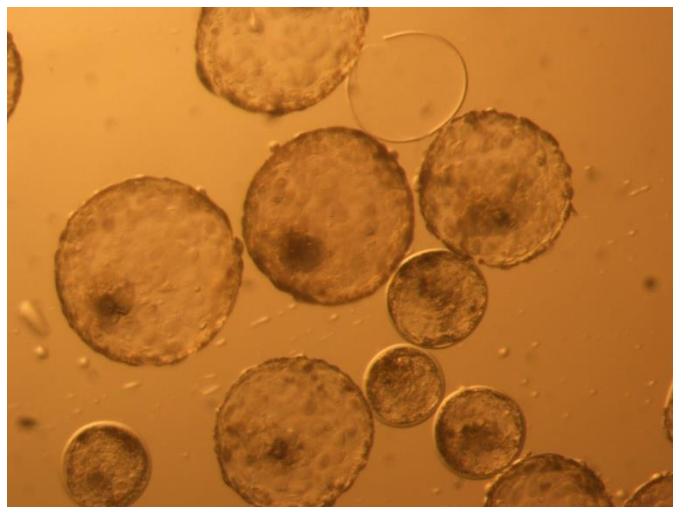


Figura 12, embrioni di bufalo in vitro

Risultati della sperimentazione con il resveratrolo nel bovino

Per quanto riguarda la sperimentazione con il resveratrolo, i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'incorporazione di tale antiossidante nell'extender aumenta l'integrità di membrana, migliorando la qualità spermatica in entrambe le specie. In particolare nella specie bovina, anche se non sono emerse differenze statisticamente significative nelle percentuali di motilità e vitalità spermatica, è stata osservata una certa tendenza a valori più alti di entrambi i parametri con la concentrazione di 50 μ M (Figura 13).

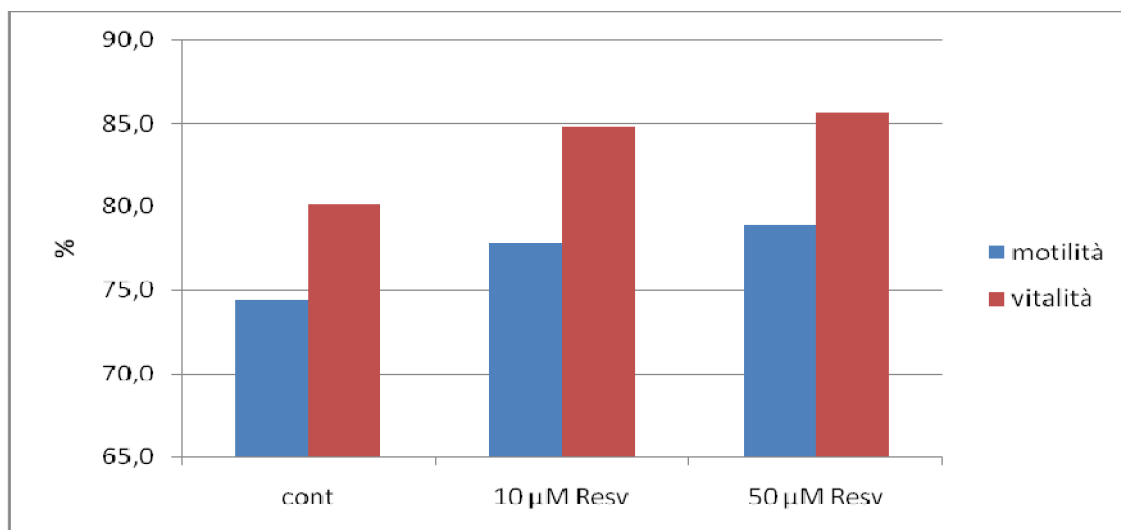


Figura 13, Parametri di motilità e vitalità spermatica registrati allo scongelamento del seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 10 e 50μM resveratrolo

Il risultato più interessante della sperimentazione con tale sostanza consiste nella diminuzione significativa ($P < 0.05$) della percentuale di spermatozoi capacitati (pattern B) che si accompagna ad un aumento ($P < 0.05$), invece, dei non capacitati (pattern F), registrati in entrambi i gruppi trattati rispetto al controllo, valutati mediante CTC (Figura 14). Nessuna differenza è invece emersa nelle percentuali di spermatozoi con perdita dell'acrosoma (pattern AR) che si sono, però, mantenute in tutti i gruppi a livelli molto bassi (in media 1.5 ± 0.05).

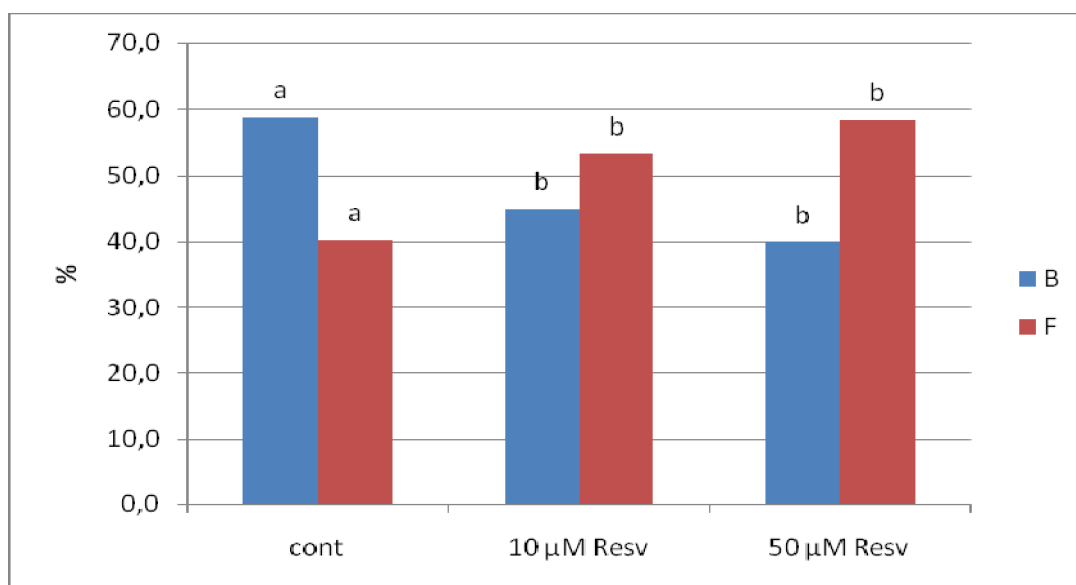


Figura 14, Percentuali di spermatozoi non capacitati e capacitati (pattern F e B del CTC assay, rispettivamente) registrate allo scongelamento di seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 10 e 50μM resveratrolo.

^{a, b} Colonne con lettere differenti sono significativamente differenti; $P < 0.05$

Anche il test della fosforilazione delle proteine tirosiniche ha mostrato l'efficacia del resveratrolo alla concentrazione maggiore testata nel ridurre la

criocapacitazione, come indicato dalle percentuali inferiori ($P < 0.05$) di spermatozoi in avanzato stato di capacitazione (Pattern EA), e dalla tendenza all'aumento degli spermatozoi non capacitati (pattern NF) in tale gruppo rispetto al controllo (Figura 15). Non sono, invece, emerse differenze nel pattern E (0.1, 0.2 e 0.0 rispettivamente per i gruppi controllo, 10 e 50 μM resveratrolo) e nel pattern A (85.7, 75.2 e 86.4 rispettivamente per i gruppi controllo, 10 e 50 μM resveratrolo).

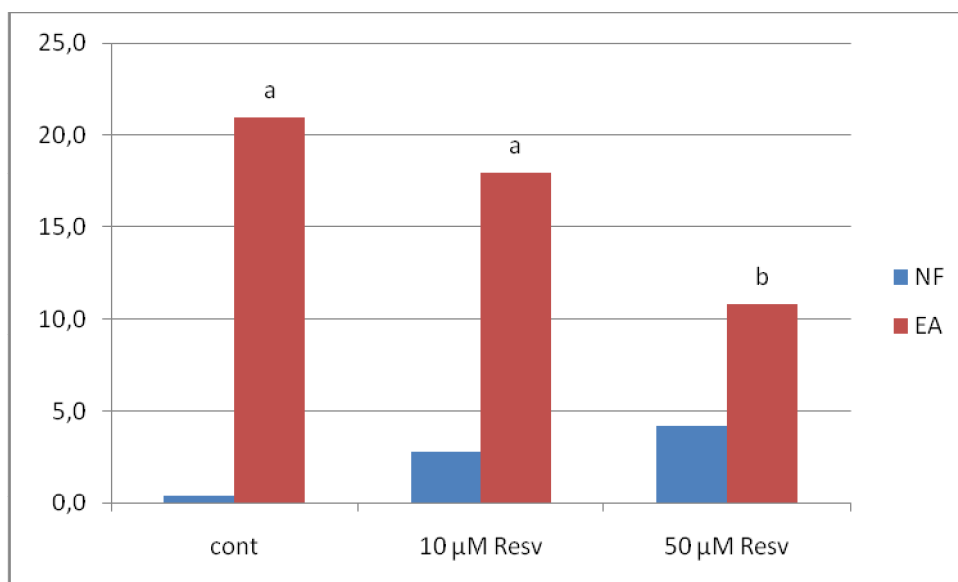


Figura 15, Percentuali di spermatozoi non capacitati e in avanzato stato di capacitazione (pattern NF ed EA rispettivamente, del test di fosforilazione tirosinica delle proteine) registrate allo scongelamento di seme bovino diluito in extender standard (controllo)

Nonostante il miglioramento dell'integrità della membrana spermatica, e, quindi, nella riduzione della criocapacitazione, non sono emerse differenze statisticamente significative relativamente alla capacità fecondante degli spermatozoi, valutata mediante fecondazione in vitro (Tabella 9).

Tabella 9, Percentuali di cleavage e resa embrionale (TM-BI) dopo fecondazione in vitro di oociti con seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 10 e 50 μM resveratrolo, su un totale di 7 repliche.

Gruppo	n	Cleavage n.(%)	TM-BI n.(%)
Controllo	282	220 (78.0)	108 (38.29)
10 μM Resveratrolo	286	223 (78.0)	112 (39.16)
50 μM Resveratrolo	285	229 (80.4)	125 (43.85)

Risultati della sperimentazione con il resveratrolo nel bufalo

I risultati ottenuti nella specie bufalina hanno dimostrato che l'incorporazione di tale antiossidante nell'extender aumenta l'integrità di membrana, migliorando la qualità spermatica e in maniera significativa la percentuale di penetrazione normospermica. Non sono emerse differenze statisticamente significative nelle percentuali di motilità e vitalità spermatica, tuttavia, anche in questo caso, è stata osservata una tendenza al miglioramento della vitalità con la concentrazione di 50 μ M (Figura 16).

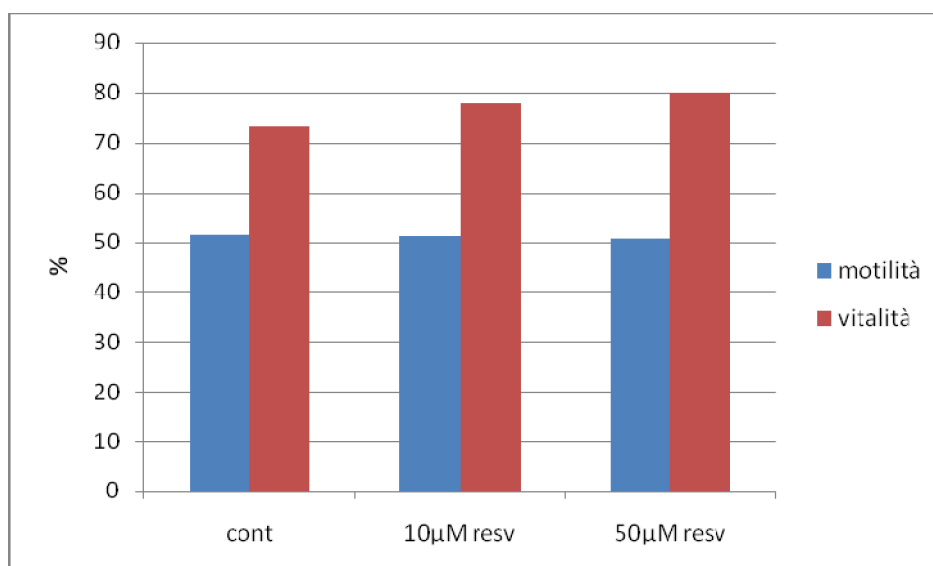


Figura 16, Parametri di motilità e vitalità spermatica registrati allo scongelamento del seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 10 e 50 μ M resveratrolo.

Nessuna differenza è invece emersa tra i pattern di CTC, che hanno mostrato valori molto simili tra i gruppi, come mostrato in Tabella 10.

Tabella 10, Percentuali di spermatozoi non capacitati e capacitati (pattern F e B del CTC assay, rispettivamente) registrate allo scongelamento di seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 10 e 50 μ M resveratrolo.

Gruppi	N.	F- pattern	B-pattern	AR-pattern
Controllo	1600	33.9 \pm 2.5	62.3 \pm 2.1	3.9 \pm 0.9
10 μ M resv	1600	36.1 \pm 2.1	60.2 \pm 1.9	3.7 \pm 0.9
50 μ M resv	1600	34.6 \pm 2.2	62.1 \pm 2.1	3.6 \pm 0.7

I cambiamenti più rilevanti nei pattern della fosforilazione delle proteine tirosiniche riguardano i pattern A ed EA (Figura 17). Infatti, entrambe le concentrazioni di resveratrolo testate (10 and 50 μ M) hanno aumentato ($P < 0.01$) in maniera dose dipendente la percentuale di spermatozoi con pattern A, diminuendo quella degli spermatozoi con pattern EA, rispetto al gruppo controllo. In particolare, il trattamento con 50 μ M è risultato più efficace nel diminuire ($P < 0.01$) il pattern EA rispetto al

trattamento con 10 μM ($P=0.055$). Nessuna differenza, invece, è stata osservata tra i gruppi per il pattern NF (in media $4.8\pm 0.5\%$) e il pattern E (in media $4.9\pm 0.6\%$).

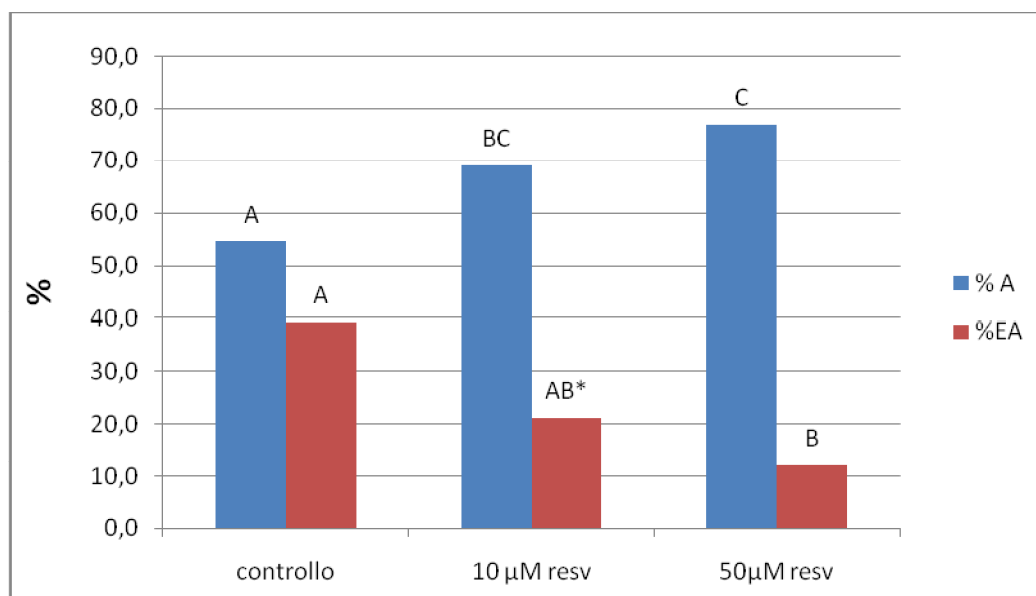


Figura 17, Percentuali di spermatozoa con basso ed elevato livello di capacitazione (pattern A ed EA rispettivamente, del test di fosforilazione tirosinica delle proteine) registrate allo scongelamento di seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 10 e 50 μM resveratrolo.

A, B, C **Colonne con lettere diverse sono significativamente differenti ; $P<0.01$**

* **$P=0.055$**

Sulla base dei risultati ottenuti con i test di fertilità, la concentrazione 50 μM è stata selezionata per valutare l'influenza del resveratrolo sulla capacità fecondante in vitro nella specie bufalina. Tale concentrazione è risultata efficace non solo nel miglioramento dell'integrità della membrana spermatica, e, quindi, nella riduzione della criocapacitazione, ma anche della capacità fecondante, che, infatti è aumentata in maniera significativa ($P<0.05$). In particolare, sebbene le percentuali di cleavage, penetrazione totale e polispermia sono risultate simili tra i gruppi, la percentuale di penetrazione normospermica è migliorata ($P<0.05$) quando il seme è stato trattato con 50 μM di resveratrolo, come mostrato in tabella 11.

Tabella 11, Percentuali di cleavage, penetrazione totale, penetrazione normospermica e polispermia dopo fecondazione in vitro di oociti con seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e nell'extender innovativo, arricchito con 50 μM resveratrolo, su un totale di 7 repliche.

Gruppi	N.	Cleavage	Penetrazione Totale	Penetrazione Normospermica	Polispermia
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Controllo	226	104(46.0)	125(55.3)	116(51.3) ^a	9(4.0)
50 μM resv	227	118 (52.0)	141(62.1)	138(60.8) ^b	3(1.3)

^{a, b} **Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P< 0.05$**

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione con il resveratrolo, in entrambe le specie, indicano che tale sostanza agisce in maniera dose dipendente con una significativa riduzione del livello di capacitazione con la concentrazione più alta testata (50 μ M). La riduzione delle modificazioni della membrana spermatica indotte dalla crioconservazione è dovuta alle proprietà antiossidanti del resveratrolo, che la proteggono dall'attacco dei metaboliti tossici generati dall'ossigeno durante il processo di crioconservazione. È noto che composti polifenolici come il resveratrolo, sono facilmente incorporati nel bilayer lipidico della membrana spermatica, inibendo la formazione di radicali liberi e mantenendo l'integrità di membrana e l'equilibrio ionico della cellula. Per questi motivi, si può assumere che la riduzione dei danni da crioconservazione sia correlata alla capacità del resveratrolo di ridurre la perossidazione lipidica.

Risultati della sperimentazione con la carnitina nel bovino

Per quanto riguarda la sperimentazione con la carnitina, i risultati ottenuti hanno dimostrato che l'incorporazione di tale antiossidante nell'extender agisce in maniera diversa tra le due specie. In particolare, nel bovino, la carnitina ha aumentato la vitalità e la motilità spermatica (Figura 18), anche se non in maniera significativa, ma non ha avuto alcun effetto sul miglioramento dell'integrità di membrana (Tabella 12 e Figura 19).

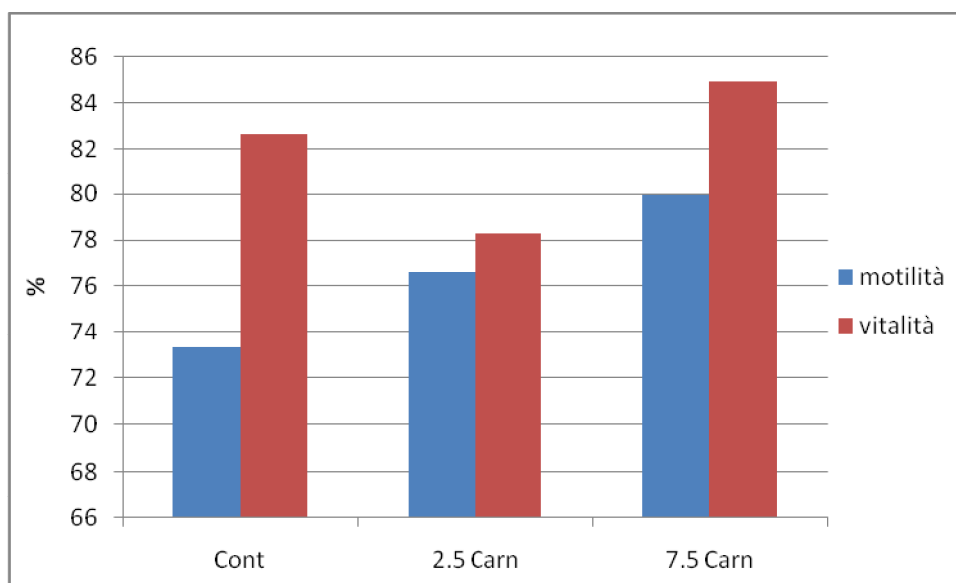


Figura 18, Parametri di motilità e vitalità spermatica registrati allo scongelamento del seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 2.5 e 7.5 mM carnitina.

Nessuna differenza è emersa nei pattern di fosforilazione tirosinica delle proteine nei gruppi trattati rispetto al controllo, come mostrato in Tabella 12.

Tabella 12, Percentuali di spermatozoi con i diversi pattern di fosforilazione tirosinica delle proteine: NF (non capacitati), A (basso livello di capacitazione), E (medio livello di capacitazione) ed EA (alto livello di capacitazione), registrate allo scongelamen

Gruppi	N	NF	E	A	EA
Controllo	1600	0.7±0.01	0.08±0.00	83.5±0.00	15.7±0.08
2.5mM Carn	1600	0.9±0.05	0.08±0.00	78.6±0.07	20,3±0.05
7.5mM Carn	1600	1.0±0.03	0.08±0.00	75.9±0.02	23.0±0.05

Per quanto riguarda il CTC assay, nessuna differenza significativa è stata evidenziata tra i gruppi trattati rispetto al controllo. Tuttavia, è stata osservata una certa tendenza a valori più alti del pattern F (spermatozoi non capacitati) con un conseguente decremento del pattern B (spermatozoi non capacitati) all'aumentare della concentrazione di carnitina testata (Figura 19). Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi per il pattern AR (in media 0.86±0.5%).

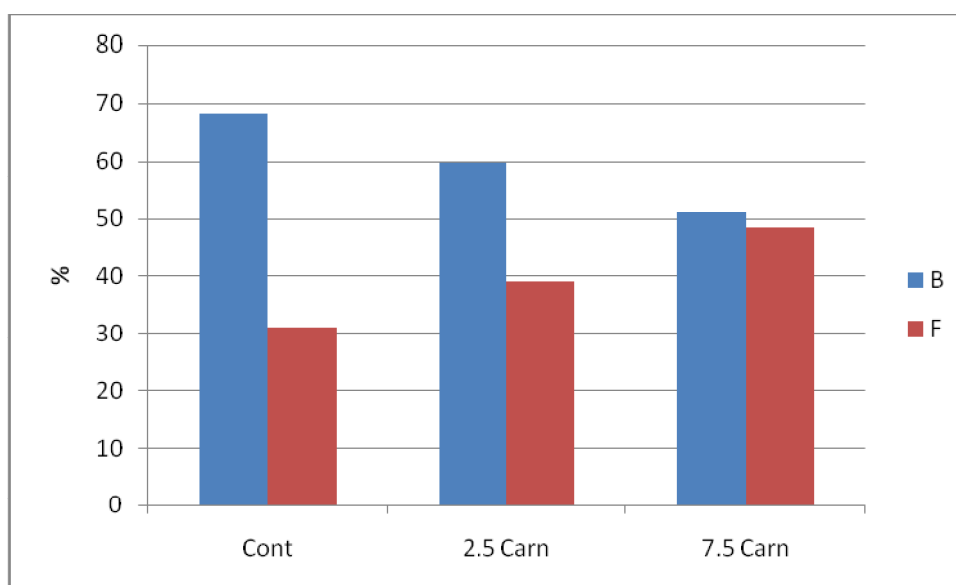


Figura 19, Percentuali di spermatozoi non capacitati e capacitati (pattern F e B del CTC assay, rispettivamente) registrate allo scongelamento di seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 2.5 e 7.5 mM carnitina.

La mancata riduzione della criocapacitazione in risposta al trattamento con la carnitina, è stata confermata anche dai risultati ottenuti in vitro sulla capacità fecondante degli spermatozoi. Infatti, non sono emerse differenze statisticamente significative tra il gruppo controllo e quelli trattati (Tabella 13).

Tabella 13, Percentuali di cleavage e resa embrionale (TM-BI) dopo fecondazione in vitro di oociti con seme bovino diluito in extender standard (controllo) e nell'extender innovativo, arricchito con 2.5 e 7.5mM carnitina, su un totale di 7 repliche.

Gruppo	n	Cleavage n.(%)	TM-BI n.(%)
Controllo	290	218 (75.17)	114 (39.31)
2.5mM Carnitina	295	225 (76.27)	111 (37.62)
7.5mM Carnitina	285	215 (75.43)	113 (39.64)

Risultati della sperimentazione con la carnitina nel bufalo

I risultati ottenuti nella specie bufalina, invece, hanno dimostrato che l'incorporazione di tale antiossidante nell'extender aumenta significativamente la motilità ($P < 0.05$; Figura 20), ma non la vitalità né la capacità fecondante. Inoltre è emerso un miglioramento significativo dell'integrità di membrana ($P < 0.01$) come mostrato dalla riduzione del numero di spermatozoi con un avanzato stato di capacitazione.

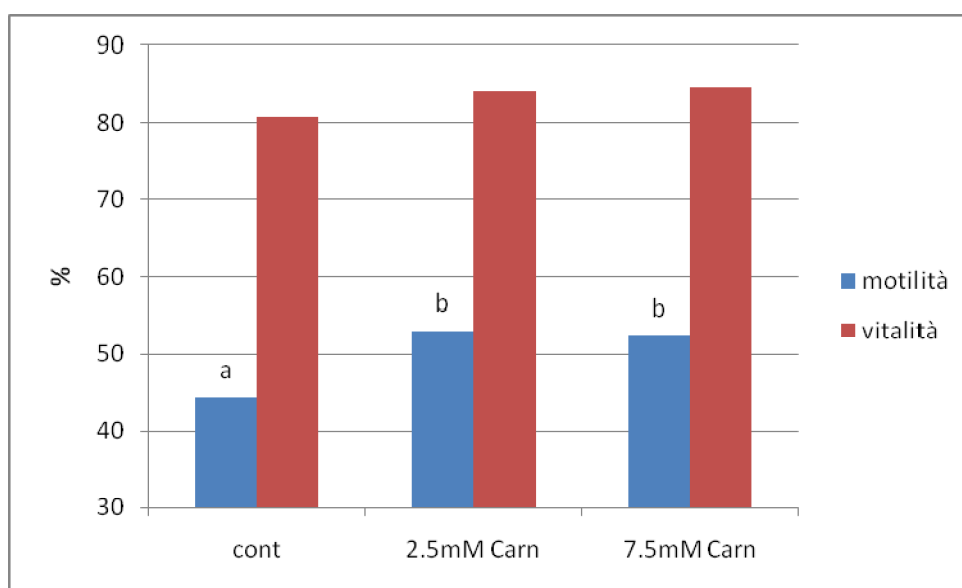


Figura 20, Parametri di motilità e vitalità spermatica registrati allo scongelamento del seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 2.5 e 7.5 mM carnitina.

^{a, b} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.05$

È stato dimostrato che l'incorporazione della carnitina nel mestruo diluitore riduce il pattern EA. In particolare, questo pattern diminuisce in entrambi i gruppi trattati rispetto al controllo, ma l'effetto è maggiore ($P < 0.01$) con la concentrazione più alta testata (Tabella 14). Inoltre, con la concentrazione 7.5mM carnitina è stato osservato un aumento ($P < 0.05$) del pattern A rispetto al controllo. Un altro risultato interessante della sperimentazione con tale sostanza consiste nell'aumento ($P < 0.01$)

della percentuale di spermatozoi con pattern NF, nel gruppo trattato con 7.5mM carnitina. Nessuna differenza tra i gruppi, invece, è emersa nel pattern E (Tabella 14).

Tabella 14, Percentuali di spermatozoi con i diversi pattern di fosforilazione tirosinica delle proteine: NF (non capacitati), A (basso livello di capacitazione), E (medio livello di capacitazione) ed EA (alto livello di capacitazione), registrate allo scongelamento di seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 2.5 e 7.5 mM carnitina.

Gruppi	N.	NF- pattern	A- pattern	E- pattern	EA- pattern
Controllo	1600	2.8 ± 1.0 ^A	65.8 ± 3.6 ^a	1.1 ± 0.8	30.3 ± 3.8 ^{Aa}
2.5mM carn	1600	5.1 ± 1.9 ^A	75.8 ± 2.7 ^{ab}	0.4 ± 0.3	18.8 ± 2.8 ^b
7.5mM carn	1600	16.5 ± 3.4 ^B	76.3 ± 2.8 ^b	0.0 ± 0.0	7.2 ± 1.9 ^{Bc}

^{A, B} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; P < 0.01

^{a, b, c} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; P < 0.05

I risultati relativi al CTC assay mostrano che l'aggiunta di carnitina, prima del congelamento, riduce la criocapacitazione in maniera dose dipendente (Tabella 15). Infatti, la percentuale di spermatozoi con pattern F aumenta (P < 0.01), mentre quella con pattern B diminuisce (P < 0.01) in entrambi i gruppi trattati rispetto al controllo. Inoltre, all'interno dei gruppi trattati, la concentrazione più alta è stata quella più efficace nel ridurre i danni da congelamento, come indicato dall'aumento (P < 0.01) delle percentuali degli spermatozoi con pattern F (P < 0.01) e dal decremento di quelle con pattern B. Nessuna differenza tra i gruppi è emersa per il pattern AR, come mostrato in Tabella 15.

Tabella 15, Percentuali di spermatozoi non capacitati, capacitati e con reazione acrosomiale (pattern F, B e AR del CTC assay, rispettivamente) registrate allo scongelamento di seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 2.5 e 7.5 mM carnitina.

Gruppi	N.	F- pattern	B- pattern	AR- pattern
Controllo	1600	31.3 ± 2.1 ^A	63.8 ± 1.8 ^A	4.9 ± 0.9
2.5mM carn	1600	49.4 ± 2.2 ^B	46.8 ± 2.2 ^B	3.8 ± 0.6
7.5mM carn	1600	60.3 ± 3.6 ^C	37.2 ± 1.8 ^C	2.6 ± 1.9

^{A, B, C} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; P < 0.01

Per ciò che concerne i risultati sulla capacità fecondante in vitro, simili percentuali di cleavage, penetrazione totale, normospermica e polispermica sono state riportate tra il gruppo controllo e quelli trattati con la carnitina (Tabella 16).

Tabella 16, Percentuali di cleavage, penetrazione totale, penetrazione normospermica e polispermica dopo fecondazione in vitro di oociti con seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e nell'extender innovativo, arricchito con 2.5 e 7.5mM carnitina, su un totale di 6 repliche.

Gruppi	N.	Cleavage	Penetrazione Totale	Penetrazione Normospermica	Penetrazione Poli spermica
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Controllo	429	207 (48.4)	239 (55.1)	234 (53.6)	3 (0.9)
2.5mM Carn	430	228 (51.3)	253 (56.9)	252 (56.6)	1 (0.3)
7.5mM Carn	403	198 (45.2)	233 (53.5)	218 (50.4)	2 (0.6)

I risultati relativi alla sperimentazione con la carnitina hanno evidenziato così come nel resveratrolo un effetto dose dipendente solo nella specie bufalina. Nessuna variazione è stata, invece, riportata nella specie bovina, e questo potrebbe essere imputabile a differenze specie specifiche e alla diversa qualità di partenza del materiale seminale. Comunque, la riduzione dei danni da criocapacitazione, emersa nella sperimentazione sul seme bufalino, può essere attribuita alle capacità antiossidanti della carnitina nel ridurre la disponibilità di lipidi per la perossidazione. I lipidi sono componenti di base del seme, contribuiscono alla struttura della membrana spermatica, al metabolismo delle sue cellule e alla loro abilità di fecondare il gamete femminile. In particolare, la carnitina riduce la quantità di lipidi, trasportando gli acidi grassi nei mitocondri, dove attraverso la β -ossidazione si produce energia sotto forma di adenosina trifosfato. Nonostante l'evidente riduzione dei danni da criocapacitazione, il nuovo extender qui sperimentato non ha migliorato la capacità fecondante in vitro.

Risultati della sperimentazione il colesterolo nel bovino

Come descritto in precedenza, le elevate percentuali di spermatozoi con danni da criocapacitazione ha indotto a pianificare una strategia alternativa per il miglioramento della qualità del materiale seminale, con l'aggiunta all'extender del complesso colesterolo-ciclodestrine (CLC) per stabilizzare la membrana spermatica prima del congelamento. Poiché l'efflusso di colesterolo dalle membrane spermatiche gioca un ruolo importante nell'innescare il processo di capacitazione, è stato ritenuto interessante verificare se un aumento del colesterolo contenuto nel materiale seminale, usando il complesso CLC, possa ridurre la capacitazione prematura indotta dal processo di congelamento e, quindi, migliorare la fertilità.

Per entrambe le specie sono riportati i dati del seme fresco, poiché il trattamento con il colesterolo risulta particolarmente efficace nel ridurre i danni da criocapacitazione fino a valori fisiologici.

I risultati ottenuti nella specie bovina hanno dimostrato che l'incorporazione del complesso CLC nell'extender aumenta l'integrità di membrana, migliorando la qualità spermatica.

Prima del congelamento, le percentuali di vitalità e motilità registrate erano molto elevate, tuttavia il processo di crioconservazione ha ridotto entrambi i parametri sia nel

controllo congelato che nei gruppi trattati con il CLC. In particolare la motilità è significativamente diminuita ($P < 0.05$) in tutti i gruppi congelati rispetto al seme fresco, Tra i gruppi congelati non sono emerse differenze statisticamente significative nelle percentuali di motilità e vitalità spermatica, tuttavia un incremento di questi due parametri è stato registrato per entrambi i gruppi trattati con CLC e in particolare per la concentrazione 1.5 mg/mL (Figura 21).

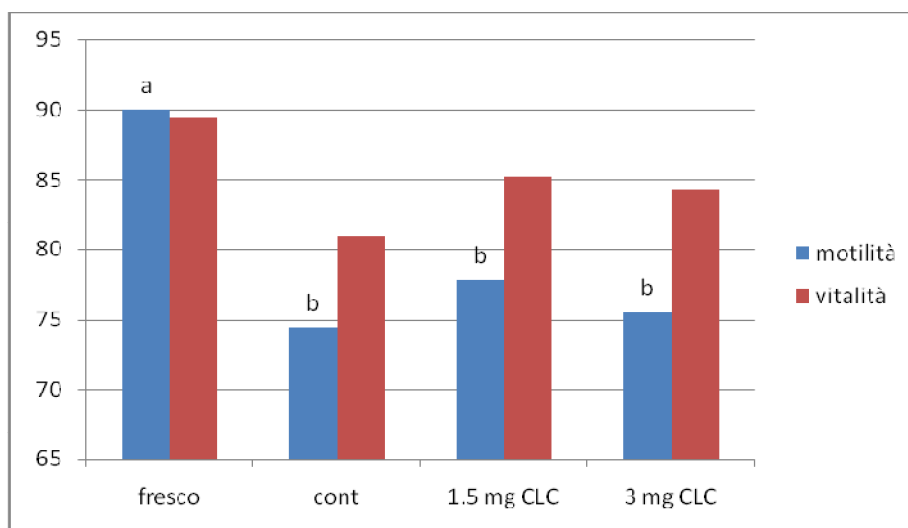


Figura 21, Parametri di motilità e vitalità spermatica registrati nel fresco e allo scongelamento del seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 1.5 e 3 mg/mL di CLC.

a, b Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.05$.

Con il test della fosforilazione delle proteine tirosiniche è stata dimostrata l'efficacia del colesterolo in entrambi i gruppi trattati, nel ridurre la criocapacitazione. In particolare, per il pattern EA sono state registrate percentuali inferiori ($P < 0.05$) per il gruppo 1.5mg/mL CLC rispetto al fresco e al controllo congelato. Inoltre si è osservato un aumento ($P < 0.01$) significativo del pattern NF in entrambi i gruppi trattati con il complesso CLC rispetto al fresco e al controllo congelato (Figura 22). Non sono, invece, emerse differenze nel pattern E (in media 0.04 ± 0.00) e nel pattern A (in media 81.71 ± 0.67).

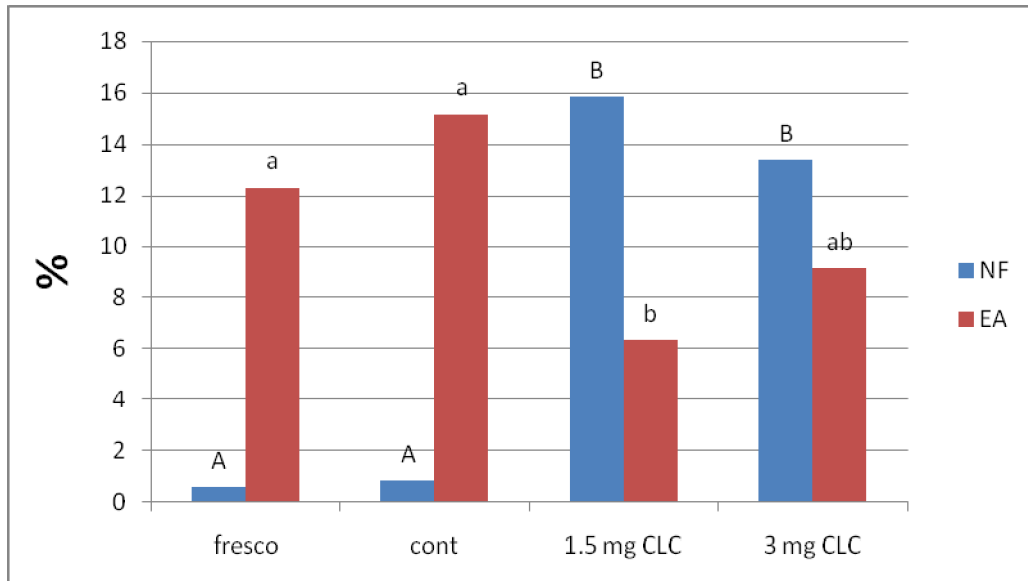


Figura 22 Percentuali di spermatozoi non capacitati e con elevato livello di capacitazione (pattern NF ed EA rispettivamente, del test di fosforilazione tirosinica delle proteine) registrate nel fresco e allo scongelamento di seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 1.5 e 3 mg/mL CLC

A, B Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.01$

a, b Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.05$.

Anche con il CTC assay è stata osservata una riduzione dello stato di capacitazione degli spermatozoi, con valori comparabili a quelli del seme fresco. In particolare, si è osservata una riduzione significativa ($P < 0.01$) del pattern B (capacitati) accompagnata ad un aumento ($P < 0.01$) del pattern F (non capacitati) in entrambi i gruppi trattati rispetto al controllo (Figura 23). Nessuna differenza è invece emersa nelle percentuali di spermatozoi con perdita dell'acrosoma (pattern AR) che si sono mantenute in tutti i gruppi a livelli molto bassi (in media 0.8 ± 0.05).

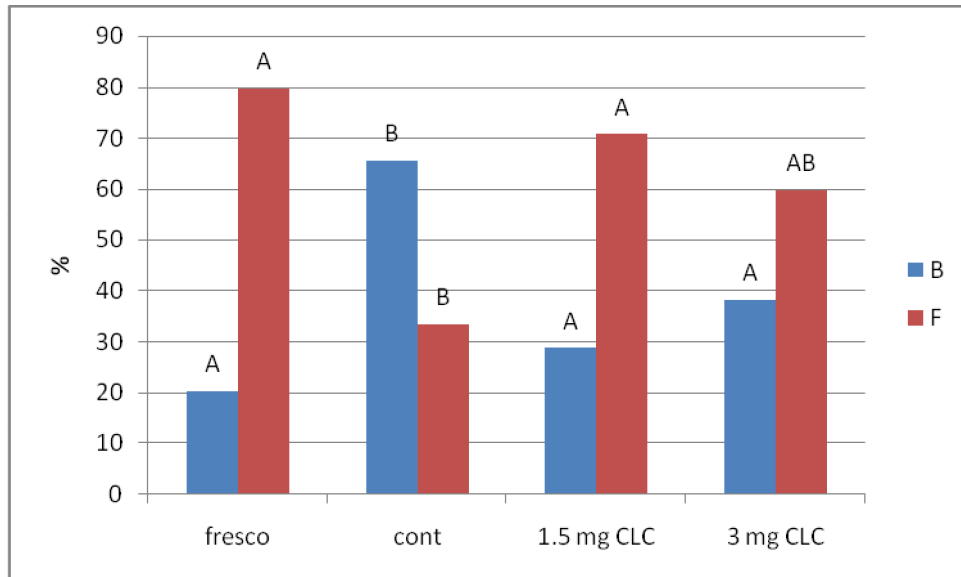


Figura 23, Percentuali di spermatozoi non capacitati e capacitati (pattern F e B del CTC assay, rispettivamente) registrate nel fresco e allo scongelamento di seme bovino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 1.5 e 3 mg/mL CLC.

^{A, B} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.01$

Risultati della sperimentazione con il colesterolo nel bufalo

I risultati ottenuti nella specie bufalina hanno dimostrato che l'incorporazione del complesso CLC nell'extender aumenta l'integrità di membrana, migliorando la qualità spermatica. Prima del congelamento, le percentuali di vitalità e motilità registrate erano molto elevate, tuttavia il processo di crioconservazione ha ridotto entrambi i parametri sia nel controllo congelato che nei gruppi trattati con il CLC. In particolare nel seme congelato di tutti i gruppi la motilità diminuisce ($P < 0.01$) significativamente, come mostrato in Figura 24.

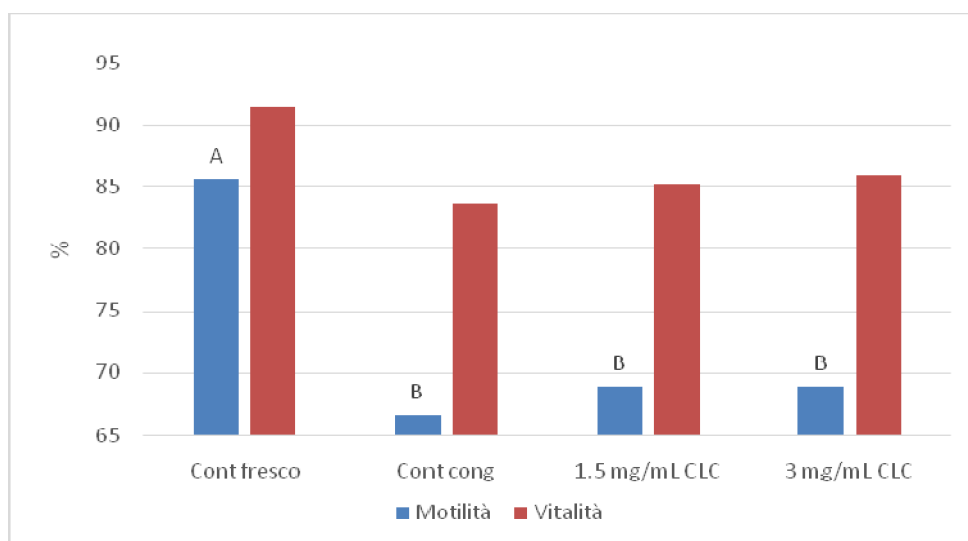


Figura 24, Parametri di motilità e vitalità spermatica registrati nel fresco e allo scongelamento del seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 1.5 e 3 mg/mL di CLC.

^{A, B} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.01$

I risultati riguardanti l'effetto della supplementazione con il colesterolo, con la tecnica della fosforilazione delle proteine tirosiniche, sono mostrati in Tabella 17. Il trattamento del seme con la concentrazione 3 mg/mL CLC ha aumentato ($P < 0.01$) la percentuale degli spermatozoi non ó fluorescenti (pattern NF) rispetto al seme fresco. Tra i gruppi congelati, il controllo ha mostrato una più bassa percentuale di pattern NF rispetto ai gruppi 1.5mg/mL ($P < 0.05$) e 3mg/mL ($P < 0.01$) CLC. Inoltre, un aumento ($P < 0.05$) della percentuale del pattern A è stato osservato nel gruppo 3mg/mL rispetto al seme fresco. Nessuna differenza è stata osservata tra i gruppi per il pattern E, mentre una riduzione ($P < 0.01$) della percentuale di spermatozoi con un elevato stato di capacitazione (pattern EA) è stata registrata in entrambi i gruppi trattati con CLC rispetto al controllo, mostrando addirittura valori simili a quelli registrati per il seme fresco (Tabella 17).

Tabella 17, Percentuali di spermatozoi con i diversi pattern di fosforilazione tirosinica delle proteine: NF (non capacitati), A (basso livello di capacitazione), E (medio livello di capacitazione) ed EA (alto livello di capacitazione), registrate nel fresco e allo scongelamento di seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 1.5 e 3 mg/mL CLC

Gruppi	N.	NF-pattern	A-pattern	E-pattern	EA-pattern
Fresco	1600	11.0 ± 6.9 ^A	78.0 ± 8.2 ^a	0.0 ± 0.0	11.0 ± 3.5 ^B
Congelato	1600	1.6 ± 0.7 ^{Aa}	60.9 ± 6.9 ^{ab}	0.1 ± 0.1	37.3 ± 6.9 ^A
1.5mg/mL	1600	24.6 ± 4.3 ^b	64.6 ± 1.8 ^{ab}	0.0 ± 0.0	10.8 ± 3.3 ^B
3 mg/mL	1600	41.8 ± 3.6 ^B	63.9 ± 3.3 ^b	0.5 ± 0.5	5.6 ± 1.6 ^B

^{A, B} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.01$

^{a, b} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.05$

I risultati ottenuti mediante il CTC assay, sono mostrati in Tabella 18. Nel seme fresco, così come ci si attendeva, la percentuale di spermatozoi con pattern F era maggiore ($P < 0.01$) rispetto ai gruppi congelati. Analogamente la percentuali di spermatozoi con pattern B è risultata significativamente ridotta ($P < 0.05$). Inoltre, tra i gruppi congelati, il trattamento con il colesterolo ha aumentato ($P < 0.01$) il pattern F e ridotto ($P < 0.01$) il pattern B rispetto al controllo con la concentrazione 1.5 mg/mL risultata essere la più efficace (Tabella 18).

Tabella 18, Percentuali di spermatozoi non capacitati e capacitati (pattern F e B del CTC assay, rispettivamente) registrate nel fresco e allo scongelamento di seme bufalino diluito in extender standard (controllo) e negli extender arricchiti con 1.5 e 3 mg/mL CLC

Gruppi	N.	F- pattern	B- pattern	AR- pattern
Fresco	1600	78.1 ± 3.3 ^A	21.9 ± 3.3 ^{Aa}	0.0 ± 0.0
Controllo	1600	28.6 ± 3.3 ^B	69.6 ± 3.4 ^B	1.8 ± 0.7
1.5mg/mL	1600	61.5 ± 1.7 ^{Ca}	37.8 ± 1.5 ^{ACb}	0.8 ± 0.4
3 mg/mL	1600	47.6 ± 4.3 ^{Cb}	51.3 ± 4.7 ^C	1.1 ± 0.6

^{A, B, C} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.01$

^{a, b} Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.05$

È risaputo che il processo di congelamento induce una perdita di colesterolo che è parzialmente responsabile dello stato di capacitazione del seme congelato. Ciò è particolarmente evidente nel seme bufalino, in cui c'è un più basso rapporto colesterolo: fosfolipidi. Pertanto, la forte riduzione del livello di capacitazione osservata, in entrambe le specie, con il trattamento con il colesterolo, suggerisce che l'aggiunta di questa sostanza, prima del congelamento, riduce la sensibilità delle membrane spermatiche ai danni da freddo.

È importante sottolineare che il seme utilizzato per la fecondazione in vitro, opportunamente capacitato, riesce a raggiungere e fecondare la cellula uovo in un lasso di tempo inferiore, rispetto al normale processo che avviene in vivo. Infatti, in questo caso gli spermatozoi devono effettuare la risalita all'interno delle vie genitali femminili fino all'ampolla tubarica e contemporaneamente subire il processo di capacitazione; va da sé che l'intero processo richiede un periodo di tempo decisamente maggiore. Per cui al fine di valutare l'effettivo miglioramento della qualità seminale, in seguito all'integrazione degli antiossidanti ai mestruai diluitori, non è possibile prescindere dalla sperimentazione in campo mediante IS.

Il cleavage, la penetrazione e la resa embrionale in vitro, nonché i test di valutazione del seme, rappresentano dei validi indicatori predittivi della reale potenzialità del materiale seminale. Per cui, sulla base dei risultati ottenuti nella sperimentazione in vitro con resveratrolo, carnitina e colesterolo è stato possibile individuare le sostanze e le relative concentrazioni migliori da testare in campo. In particolare, nella fase applicativa, così come previsto dal progetto, è stato testato, nel bovino, il seme trattato con 50µM resveratrolo rispetto al seme non trattato. Inoltre, mediante una collaborazione consolidata, con liberi professionisti operanti sul territorio campano, è stato possibile perseguire la sperimentazione anche nella specie bufalina, testando sia il resveratrolo come descritto per la specie bovina, sia il colesterolo, con entrambe le concentrazioni testate in vitro, data la sorprendente riduzione della capacitazione con conseguente stabilizzazione della membrana spermatica ottenuta nella fase di sperimentazione.

Al termine della fase sperimentale, il DMVPA si occupato della preparazione degli extender contenenti resveratrolo o colesterolo per la diluizione del seme destinato alle prove di Inseminazione Strumentale, previste nella fase applicativa. In particolare sono stati raccolti 4 eiaculati consecutivi di due tori per specie (4 missioni).

Tempistica d'attuazione

Le attività svolte dal DMVPA sono state effettuate, in modo più o meno continuativo, dal febbraio 2015 al giugno 2015.

Il Centro Tori Chiacchierini ha messo a disposizione da febbraio 2015 a giugno 2015 gli animali ed il seme per la sperimentazione, le strutture e le attrezzature aziendali, oltre al personale per le attività previste dal protocollo. Per le attività previste il partner si è avvalso anche delle prestazioni veterinarie responsabili del Centro Tori.

3.3 Fase 3: Applicativa

Questa fase è stata condotta dal DMVPA presso le aziende del partenariato (Centro Tori Chiacchierini e Società Cooperativa Agricola di Trevi). La società agricola di Trevi ha fornito il supporto logistico allo svolgimento delle attività previste, mettendo a disposizione il proprio patrimonio zootecnico per le prove di IS e la consulenza specialistica del Dott. Colagrande che, in qualità di responsabile tecnico della stalla da latte del Gruppo Cooperative di Trevi, era già a conoscenza delle dinamiche riproduttive e gestionali della suddetta stalla.

Il Centro Tori Chiacchierini ha fornito il materiale seminale per l'applicazione in campo e si è inoltre occupato del coordinamento delle attività organizzative e gestionali (n° 2 riunioni) e dei rapporti con il partenariato.

Risultati della fase applicativa nel bovino

Sulla base dei risultati ottenuti nella fase di sperimentazione su scala di laboratorio, si è proceduto alla selezione del trattamento innovativo risultato più efficace nel migliorare la fertilità maschile in vitro. Poiché il trattamento per os, non ha apportato nessun miglioramento della qualità seminale, in entrambe le specie, come descritto in precedenza, il seme così prodotto non è stato utilizzato per i test di fertilità in vitro e in vivo.

Come si evince dai risultati ottenuti nel corso delle prove sperimentali, le sostanze più efficaci sono state il resveratrolo e il colesterolo.

Pertanto, per quanto riguarda il bovino sono state condotte prove di IS su 200 soggetti dell'azienda zootecnica partner - Gruppo Cooperative Agricole di Trevi Società Cooperativa Agricola.

Le femmine sono state selezionate dopo un opportuno esame clinico, che ne ha accertato le buone condizioni sanitarie e la ciclicità e suddivise in due gruppi di inseminazione. Il primo gruppo è stato inseminato con seme convenzionale (controllo non trattato) e il secondo gruppo, con seme contenente la nuova formulazione testata in vitro, cioè quella contenente 50µM di resveratrolo. Le percentuali di gravidanza sono state valutate a 45 giorni post- inseminazione.

Le inseminazioni, per la specie bovina, sono state effettuate utilizzando solo il seme trattato con il resveratrolo e non con le altre due sostanze, al fine di non ridurre troppo la casistica, anche in considerazione della variabilità femminile e delle condizioni climatiche particolarmente avverse. Infatti, nel rispetto del cronoprogramma, la fase di sperimentazione si è conclusa nel periodo estivo (giugno-agosto), caratterizzato da elevate temperature, ben oltre le medie del periodo estivo, e ciò ha purtroppo influenzato negativamente la sfera riproduttiva delle bovine. Non sono comunque emerse differenze sui tassi di gravidanza a 30 gg tra il seme trattato e il controllo (18% vs 21%). È importante sottolineare che la qualità del materiale seminale di partenza era elevata quindi l'effetto migliorativo della sostanza è stato parzialmente mascherato, tuttavia i risultati ottenuti suggeriscono che il resveratrolo possa notevolmente migliorare la qualità seminale di tori ipofertili, consentendo di disporre di un numero maggiore di riproduttori ampliando anche la variabile genetica.

Risultati della fase applicativa nel bufalo

Poiché il miglioramento dei parametri di fertilità è stato particolarmente evidente nella specie bufalina, anche perché la qualità di partenza del seme di bufalo è normalmente inferiore, si è ritenuto opportuno estendere la fase applicativa anche a questa specie. Per perseguire tale finalità il DMVPA, mediante una collaborazione

consolidata con liberi professionisti operanti sul territorio campano, ha sperimentato due extender innovativi, addizionati rispettivamente con resveratrolo e colesterolo.

Per quanto riguarda la sperimentazione con il resveratrolo, le bufale (n.100) sono state selezionate in base alle condizioni sanitarie e alla ciclicità. Le IS sono state effettuate a tempi fissi utilizzando il protocollo Ovsynch-TAI per la sincronizzazione (16-18 h dopo la seconda iniezione di agonista del GnRH). Trenta giorni dopo l'IS, sono state eseguite le diagnosi di gravidanza mediante ecografia trans-rettale, confermate poi a 45g dopo l'IS attraverso esplorazione rettale. In particolare, le bufale sono state suddivise in due gruppi: il primo gruppo è stato inseminato con seme convenzionale (controllo non trattato) e il secondo gruppo con seme diluito nell'extender innovativo, trattato con 50µM di resveratrolo.

In questa specie l'extender innovativo arricchito con resveratrolo ha incrementato il tasso di gravidanze dopo IS sia a 30 che a 45 giorni nel gruppo trattato con l'extender innovativo contenente il resveratrolo rispetto al controllo (48.1 vs 41.2 % a 30 gg; 46.2 vs 39.0%, a 45 gg; Figura 24)

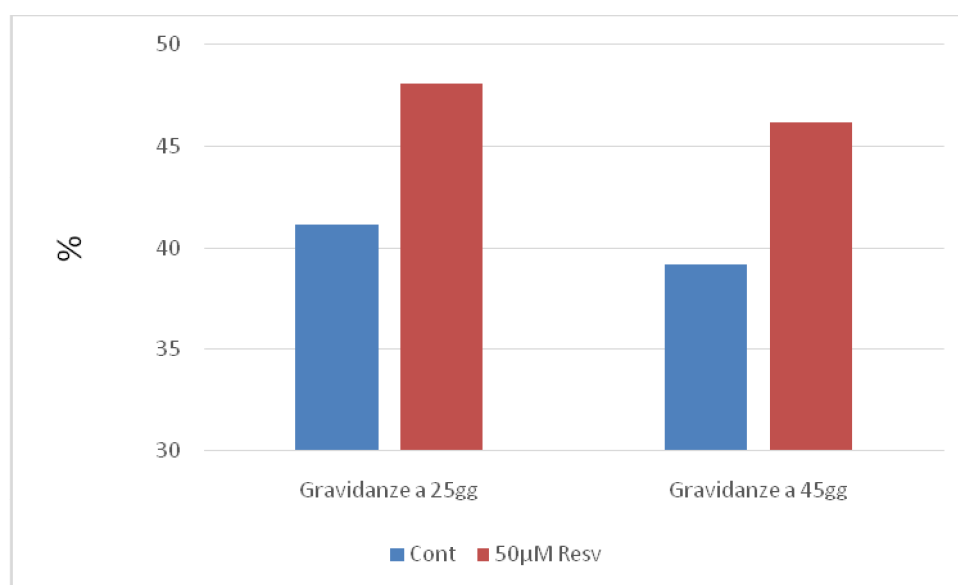


Figura 25, Percentuali di gravidanza a 30 e 45 giorni nei gruppi controllo e 50µM resveratrolo

Per quanto riguarda i risultati ottenuti nel corso della fase applicativa con la sperimentazione del colesterolo, le bufale (n.100) sono state selezionate come descritto in precedenza e divise in tre gruppi. Il primo gruppo è stato inseminato con seme convenzionale (controllo non trattato), il secondo gruppo con seme trattato con 1.5mg/mL CLC e il terzo gruppo con 3mg/mL CLC.

Anche in questo caso, le percentuali di gravidanza registrate a 30 e 45 giorni sono state simili. Tuttavia, tra i gruppi trattati con il complesso CLC, la percentuale di gravidanza a 30 giorni è diminuita ($P < 0.05$) significativamente con la concentrazione più alta testata (Figura 25).

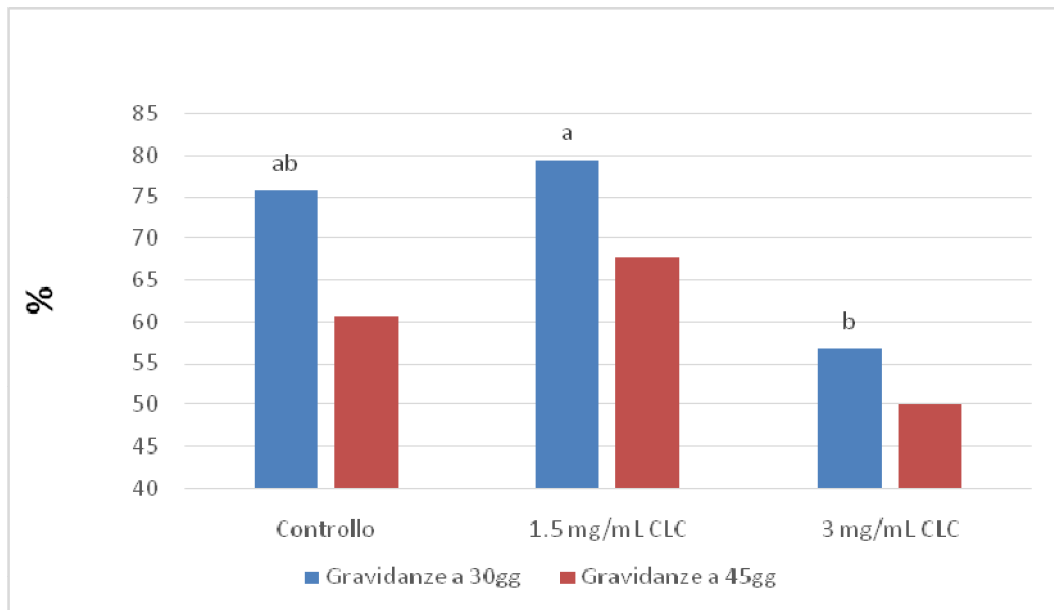


Figura 26, Percentuali di gravidanza a 30 e 45 giorni nei gruppi controllo, 1.5mg/mL e 3mg/mL CLC
 a, b Valori con diverse lettere tra le colonne sono differenti; $P < 0.05$

I risultati ottenuti nella fase applicativa per la specie bufalina, dimostrano che l'integrazione di sostanze quali resveratrolo e colesterolo migliorano la qualità spermatica e tendono a migliorare la fertilità delle mandrie. Tuttavia, il numero degli animali testati, per ogni trattamento, è troppo basso per verificare le ipotesi di partenza, ma sufficiente per attuare un'applicazione su larga scala, al fine di validare l'efficacia di tali sostanze. Inoltre, è importante sottolineare che, così come visto in precedenza, i danni da criocapacitazione sono molto evidenti nel bufalo. La possibilità, mediante l'utilizzo del complesso CLC, di stabilizzare le membrane spermatiche prima del congelamento, riducendo tali danni, potrebbe rappresentare un utile strumento al fine di incrementare il numero di tori riproduttori, che pur avendo un alto valore genetico, non sono inseriti nel piano di riproduzione nazionali, per la scarsa qualità del materiale seminale dopo crioconservazione.

Tempistica di attuazione

Le attività svolte dal DMVPA sono state effettuate, in modo più o meno continuativo, da aprile 2015 a settembre 2015.

Il Centro Tori Chiacchierini ha messo a disposizione da aprile 2015 ad agosto 2015 il seme per la sperimentazione, le strutture e le attrezzature aziendali per la conservazione e gestione dello stesso, oltre al personale per le attività previste dal protocollo. Per le attività previste il partner si è avvalso anche delle prestazioni veterinarie responsabile del Centro Tori.

Il Gruppo Cooperative Agricole di Trevi Società Cooperativa Agricola è stata interessata dalle attività nel periodo maggio 2015 ó luglio 2015 ed ha messo a disposizione gli animali per la fecondazione ed il personale per il monitoraggio dei calori e la supervisione delle attività previste dal protocollo. Il partner si è avvalso per questa fase delle prestazioni veterinarie del Dr. Colagrande.

3.4 Fase 4: divulgazione dei risultati

Il Parco Tecnologico Agroalimentare dell'Umbria si è occupato della divulgazione dei risultati del progetto attraverso la creazione di una pagina web dedicata sul proprio portale e dell'organizzazione di un seminario al termine del progetto per la divulgazione dei risultati finali, che si è svolto il 20/10/2015 presso il Centro Tori Chiacchierini. Le attività rendicontate si sono attuate nel periodo giugno ó settembre 2015.

Il DMVPA si è occupato della divulgazione dei risultati del progetto con l'organizzazione di tre eventi divulgativi. In particolare, il giorno 01/10/2015 sono stati svolti n°2 seminari presso lo stesso dipartimento, sito in via Delpino 1, Aula di Zootecnia 1° Piano rivolti agli studenti di Medicina Veterinaria, di Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali e ai borsisti e ai dottorandi di Scienze Veterinarie del XXIX e XXX ciclo:

- óStrategie innovative per il miglioramento della fertilità dei ruminanti: caratteristiche del materiale seminaleö, relatore Dott.ssa Valentina Longobardi.
- óStrategie innovative per il miglioramento della fertilità dei ruminanti: Fecondazione in vitro e Inseminazione Strumentaleö, relatore Dott. Gianluigi Zullo.

Inoltre nell'ambito della 29ª Edizione di Futuro Remoto, prima manifestazione italiana di diffusione della cultura scientifica e dell'innovazione tecnologica, i giorni 18 al 19 ottobre ore 10-22, a Piazza del Plebiscito è stato allestito uno stand (n°14) per la divulgazione dei risultati del progetto PIFEMARU, presso il Padiglione Cibo e Alimentazione.

Si riporta inoltre, una prima pubblicazione su una rivista specializzata del settore, in merito alla sperimentazione con il colesterolo nella specie bufalina:

Longobardi V, Albero G, Salzano A, Zullo G, Bifulco G, De Canditiis C, Gasparrini B. (2015). Cholesterol supplementation reduces cryocapacitation damages in buffalo (*Bubalus bubalis*) sperm. *Reproduction Fertility and Development* (in stampa).

La fase applicative è stata condotta dal PARCO PTA e dal DMVPA che hanno collaborato sinergicamente per l'organizzazione degli eventi divulgativi relativi alla sperimentazione.

4 ATTUAZIONE DEL PROGETTO E CRITICITÀ

Nonostante siano state effettuate più missioni presso il Centro Tori Chiacchierini rispetto a quelle previste, il costo complessivo è rientrato nel budget previsto per tale voce di spesa. Ciò è stato possibile perché nella maggior parte dei casi, concomitanti con i prelievi del seme oggetto della sperimentazione, è stato necessario rientrare nello stesso giorno per condurre analisi che richiedevano facilities presenti nel laboratorio di Biotecnologie Applicate all'Allevamento Animale, del DMVPA.

5 - CRONOPROGRAMMA DELLE ATTIVITÀ

Le fasi sperimentali, come evidenziato nel crono programma sottostante, sono state effettuate in conformità al Diagramma di GANTT del progetto, anche se con minime variazioni dovute ai risultati ottenuti in corso di sperimentazione così come ampiamente descritto in precedenza.

Fase	Attività	Set 14 ó Gen 15	Feb 15	Mar 15	Apr 15	Mag 15	Giu 15	Lug 15	Ago 15	Set 15	Ott 15
1	Valutazione del management, piani alimentari delle aziende (centro tori e azienda di bovine da latte)	■									
	Valutazione benessere e fertilità media dei tori presso Centro Tori	■									
	Selezione e scelta tori	■									
2	Sviluppo integratore innovativo e somministrazione		■	■	■	■					
	Prelievi sangue e seme e valutazione ecografica dei testicoli presso Centro Tori		■	■	■	■					
	Profilo metabolico, ormonale, stato di benessere dei tori				■						
	Formulazione nuovo diluitore per materiale seminale				■						
	Test di fertilità in vitro del nuovo integratore				■	■	■				
Test di fertilità in vitro dei nuovi diluitori				■	■	■					
3	Applicazione in campo mediante AI del nuovo integratore (inseminazione e valutazione gravidanze fino a 45 gg)				■	■	■	■	■	■	
	Applicazione in campo mediante AI dei nuovi diluitori (inseminazione e valutazione gravidanze fino a 45 gg)				■	■	■	■	■	■	
4	Divulgazione						■	■	■	■	■

6 RISULTATI OTTENUTI

I risultati ottenuti in questo progetto, hanno permesso di consolidare i rapporti tra impresa e mondo della ricerca al fine di agevolare il processo di diffusione dell'innovazione nel fare impresa e nella produzione.

Migliorare le capacità riproduttive del maschio è di fondamentale importanza in quanto condiziona l'efficienza di tutte le tecniche riproduttive e l'efficacia dei piani di selezione. Lo sviluppo di questi due diluitori innovativi con l'aggiunta di resveratrolo o colesterolo potrà migliorare notevolmente la qualità del materiale crioconservato, sia nella specie bovina che in quella bufalina, con indubbi vantaggi economici per gli allevatori.

La sperimentazione su scala di laboratorio e scala pilota regionale, sia in Umbria che in Campania, è stato ovviamente un punto di partenza per l'innovazione tecnologica nel settore zootecnico in grado di migliorare la redditività degli allevamenti bovini e bufalini, agendo sulle performance riproduttive sul territorio nazionale.